

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Der Einfluss eines *Enriched Environments*
und von Schlüsselproteinen der Alzheimerschen Erkrankung
auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines –
eine *in vivo* Analyse mithilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie

Christian Jung

aus Kyritz, Deutschland

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Jochen Herms betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Dissertation eingereicht am	03. September 2012
1. Gutachterin / 1. Gutachter:	Prof. Dr. Martin Biel
2. Gutachterin / 2. Gutachter:	Prof. Dr. Jochen Herms
Mündliche Prüfung am	29. Oktober 2012

„Unfortunately, nature seems unaware of our intellectual need for convenience and unity, and very often takes delight in complication and diversity.“

Santiago Ramón y Cajal, 1906

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Die strukturelle Plastizität	5
3.1.1	Die Biologie von Lernen und Gedächtnis	5
3.1.2	Die synaptische Plastizität	6
3.1.3	Dendritische Spines	7
3.1.4	Die Zwei-Photonen-Mikroskopie	9
3.1.5	Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines	13
3.2	Die Alzheimersche Erkrankung	17
3.2.1	Die Krankheit	17
3.2.2	Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	18
3.2.3	Das Amyloid-Vorläuferprotein APP	21
3.2.4	Die β -Sekretase BACE1	23
3.2.5	Präsenilin und die γ -Sekretase	24
4	Ergebnisse	27
4.1	Das <i>Enriched Environment</i> induziert strukturelle Plastizität	27
4.1.1	Der Effekt eines „ <i>Enriched Environments</i> seit der Geburt“ auf dendritische Spines sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen	27
4.1.2	Der Effekt des „ <i>Enriched Environments</i> seit der Geburt“ auf dendritische Spines basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen	30
4.1.3	Der Effekt eines akuten <i>Enriched Environments</i> auf dendritische Spines sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen	30
4.1.4	Der Effekt eines akuten <i>Enriched Environments</i> auf dendritische Spines basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen	34
4.1.5	Lentivirus-basierte Markierung kortikaler Neurone ermöglicht das <i>in vivo</i> Mikroskopieren von Axonen	34
4.1.6	Der Effekt eines akuten <i>Enriched Environments</i> auf kontralateral projizierende Axone von Neuronen des somatosensorischen Kortex	38
4.2	Der Einfluss des Amyloid-Vorläuferproteins APP auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines in jungen Tieren	39

4.3	Der Einfluss von Präsenilin1 auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines	41
4.3.1	Effekte auf die Dichte dendritischer Spines in PS1-transgenen Mäusen in Abhängigkeit von der kortikalen Schicht	41
4.3.2	Kinetische und Form-abhängige Klassifizierung dendritischer Spines in PS1-transgenen Mäusen	43
4.3.3	Prozessierung von Spine-relevanten Substraten der γ -Sekretase in PS1-transgenen Mäusen	43
4.3.4	Die Expression des Ryanoidin-Rezeptors in PS1-transgenen Mäusen	45
4.3.5	Der Effekt einer transgener Überexpression von PS1 auf das Überleben von Schicht II/III Neuronen	46
4.4	Der Einfluss von BACE1 auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines	47
4.4.1	Der Effekt des <i>knockouts</i> von BACE1 auf dendritische Spines in adulten Mäusen	48
4.4.2	Der Effekt des <i>knockouts</i> von BACE1 auf dendritische Spines in jungen Mäusen	48
4.4.3	Der Einfluss einer akuten pharmakologischen Inhibition von BACE1 auf dendritische Spines	49
5	Diskussion	53
5.1	<i>Enriched Environment</i> und dendritische Spines	53
5.2	Viraler Gentransfer für die <i>in vivo</i> Mikroskopie	57
5.3	Die strukturelle Plastizität axonaler Boutons	58
5.4	APP und dendritische Spines	59
5.5	Präsenilin1 und dendritische Spines	60
5.6	BACE1 und dendritische Spines	64
5.7	Generelle Aspekte der <i>in vivo</i> Mikroskopie dendritischer Spines	67
5.8	Schlussfolgerung	69
6	Material und Methoden	71
6.1	Mausexperimente	71
6.1.1	Mauslinien	71
6.1.2	Maushaltung	74
6.1.3	Operation eines kranialen Fensters	74
6.1.4	<i>In vivo</i> Zwei-Photonen-Mikroskopie	77
6.1.5	<i>Enriched Environment</i>	79
6.1.6	Injektion lentiviraler Vektoren	80
6.1.7	Testung des BACE1-Inhibitors SCH-1682496	82
6.1.8	Perfusion und Fixierung von Gehirngewebe	83

6.2	Immunhistochemische Methoden	84
6.2.1	Präparation und immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten	84
6.2.2	Konfokale Mikroskopie	84
6.3	Molekularbiologische Methoden	85
6.3.1	DNA-Präparation aus Mausschwanzbiopsien	85
6.3.2	PCR	85
6.3.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR	85
6.3.4	Klonierung des viralen Vektorkonstrukts	86
6.3.5	Präparation lentiviraler Vektoren	87
6.4	Proteinbiochemische Arbeiten	88
6.4.1	Herstellen von Großhirnhomogenaten	88
6.4.2	Synaptosomenpräparation	88
6.4.3	Westernblotanalyse	89
6.5	Computergestützte Datenauswertung	90
6.5.1	Auswertung der Spinedaten	90
6.5.2	Statistische Auswertung	90
6.6	Standard-Labormaterialien und Lösungen	92
7	Abkürzungsverzeichnis	95
8	Literaturverzeichnis	99
9	Eigene Veröffentlichungen	115
10	Danksagung	117

1 Zusammenfassung

Sensorische Erfahrungen verändern das neuronale Netzwerk des Nervensystems ein Leben lang. Diese Plastizität des Gehirns bildet die Grundlage für Lernen und Gedächtnis. Auf zellulärer Ebene kommt es dabei zu funktionellen und morphologischen Adaptionen der Verbindungen der Nervenzellen, den Synapsen. Um die strukturelle Plastizität in Abhängigkeit von sensorischen Erfahrungen verstehen zu können, müssen Synapsen im intakten neuronalen Netzwerk über längere Zeit untersucht werden. Die Zwei-Photonen-Mikroskopie erlaubt derartige Untersuchungen, da neuronale Strukturen bis hin zu einzelnen Synapsen in der Hirnrinde lebender Versuchstiere über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren verfolgt werden können.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer generellen sensorischen Stimulation durch ein *Enriched Environment* auf dendritische Spines analysiert. Dendritische Spines bilden das postsynaptische Kompartiment glutamaterger Synapsen entlang der Dendriten. In der vorliegenden Studie wurden diese Strukturen im somatosensorischen Kortex von Mäusen mithilfe der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie an zwei Dendritenpopulationen untersucht, den apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen und erstmalig auch den basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen. Zur Markierung von Nervenzellen exprimierten einzelne pyramidale Neurone der verwendeten Mäuse das fluoreszierende Protein YFP. Adulte Mäuse, die seit ihrer Geburt in einem *Enriched Environment* gehalten wurden, zeichneten sich durch eine erhöhte Dichte und einen gesteigerten Umsatz dendritischer Spines an beiden Dendritenpopulationen aus. Auch ein akutes *Enriched Environment* förderte die Neubildung von dendritischen Spines im Kortex adulter Mäuse und resultierte in einem Anstieg der Spine-Dichte. Der Effekt war allerdings geringer als bei dem „*Enriched Environment* seit der Geburt“. In beiden Experimenten wurden neugebildete Spines durch das *Enriched Environment* stabilisiert, was für eine feste Integration dieser Spines in das neuronale Netzwerk spricht. Weiterhin führte die akute *Enriched*-Stimulation zu einem Verlust von etablierten Spines. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass dendritische Spines ein physisches Korrelat zu Lernerfahrungen repräsentieren könnten. Zusätzlich wurde ein vermehrtes Auftreten transienter Spines beobachtet, die als weitere Folge des *Enriched Environments* dem neuronalen Netzwerk eine höhere Flexibilität verleihen könnten.

Mit lentiviralen Vektoren wurden außerdem die axonalen Boutons auf der präsynaptischen Seite fluoreszierend markiert und *in vivo* mikroskopiert. Die Beschreibung der strukturellen

Veränderungen, die durch ein *Enriched Environment* an den Präsynapsen induziert werden konnten, ist allerdings als vorläufig zu betrachten.

Der Untergang von Synapsen gilt als ursächlich für den Verlust kognitiver Fähigkeiten bei der Alzheimerschen Erkrankung, die die häufigste neurodegenerative Krankheit darstellt. Die Identifikation von Mutationen, die für eine seltene und früh einsetzende familiäre Form der Alzheimerschen Erkrankung verantwortlich sind, ermöglichte die Formulierung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die einen Erklärungsansatz für die molekularen Ursachen der Krankheit liefert. Ausgangspunkt der Hypothese ist das Amyloid β -Peptid, welches durch sukzessive proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins durch die β - und die γ -Sekretase entsteht. Die Toxizität des aggregierenden Peptids wird über das Protein Tau vermittelt und führt schließlich zu einem massiven Verlust von Synapsen und Nervenzellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Schlüsselproteine der Amyloid β -Generierung auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines untersucht. (1) Entgegen früherer Beobachtungen in adulten Tieren hatte der Verlust des Amyloid-Vorläuferproteins keine Auswirkungen auf die dendritischen Spines im somatosensorischen Kortex heranwachsender Mäuse. (2) Die transgene Überexpression von humanem Wildtyp-Präsenilin1, dem katalytischen Zentrum der γ -Sekretase, oder einer mutierten Variante des Präsenilin1, die mit der familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung assoziiert ist, resultierte in einer erhöhten Dichte dendritischer Spines. Während die Prozessierung exemplarischer Substrate der γ -Sekretase in den Präsenilin1-transgenen Mäusen nicht verändert war, konnte eine veränderte Homöostase des zellulären Kalziumhaushalts als mögliche Ursache für den Effekt auf die Spines vorgeschlagen werden. (3) Der genetische *knockout* der β -Sekretase BACE1 hatte im adulten Kortex keine Auswirkungen auf die Dichte und die Kinetik dendritischer Spines. *Ex vivo* Analysen von jungen BACE1-defizienten Tieren deuten allerdings auf eine physiologische Funktion des Proteins bei der Ausbildung dendritischer Spines. Tatsächlich führte die Testung einer pharmakologischen Inhibition von BACE1 im Kortex adulter Wildtypmäuse zu einer Reduktion der Spine-Dichte, die auf eine verminderte Entstehung dendritischer Spines zurückgeführt werden konnte. Die vorgestellten Ergebnisse machen daher auf physiologische Funktionen von Schlüsselproteinen der Alzheimerschen Erkrankung an synaptischen Strukturen aufmerksam, die bei der Entwicklung und der Evaluation therapeutischer Ansätze berücksichtigt werden müssen.

2 Summary

The neuronal circuits of the brain are not static. Sensory experiences modulate the neuronal network throughout life and this plasticity is believed to form the basis for learning and memory. On cellular level the neurons and the connections between them, the synapses, adapt to sensory stimulation by functional and morphological changes. To understand the experience-dependent structural plasticity, synapses have to be studied in their natural environment for longer periods of time. The two-photon microscopy enables such analysis, as neuronal structures up to single synapses can be imaged in the cortex of living animals for months to years.

In the first part of this work the influence of a broad sensory stimulation, applied by an enriched environment, to dendritic spines was investigated. Dendritic spines represent the characteristic shaped, postsynaptic compartment of glutamatergic synapses. Utilizing the *in vivo* two-photon microscopy two dendritic populations, the apical dendrites of layer V neurons and the basal dendrites of layer II/III neurons, were imaged in the rodent somatosensory cortex. The *in vivo* imaging of the latter class of dendrites has not been published somewhere else before. For fluorescent labelling, mice were used that transgenetically expressed YFP in a subset of pyramidal neurons in a sparse manner throughout the cortex. Adult mice, which have been kept in the enriched environment since birth, showed an enhanced spine density and an elevated turnover of dendritic spines at both dendritic populations. Similarly, an acute enriched environment increased the formation of new spines in the cortex of adult mice resulting in an enhanced spine density. Though, the effect did not reach the level of the infant-start enrichment. In both experiments newly formed spines were more often stabilized in enriched mice, indicating a functional integration of these spines into the neuronal network. Furthermore, after enrichment-stimulation established dendritic spines got lost. These findings support the hypothesis that dendritic spines might represent a physical correlate of learning experiences. Additionally, an enhanced appearance of transient spines was observable, representing a more general aspect of the enriched environment, which makes the network more flexible.

Axonal boutons were fluorescently labelled by lentiviral vectors for *in vivo* imaging. However, the results on structural changes induced by an enriched environment on these presynapses are preliminary.

The loss of synapses is regarded to be the cause for cognitive decline in patients of Alzheimer's disease, the most common neurodegenerative disorder. The identification of mutations that lead to rare familial forms of early-onset Alzheimer's disease helped to develop the amyloid cascade hypothesis as an attempt to explain the molecular causes of the disease. The generation of the amyloid β -peptide by the successive proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein by β - and γ -secretase is of central importance to this hypothesis. The toxic properties of the aggregation prone peptide are mediated by the protein tau resulting finally in a massive loss of synapses and neurons.

In the second part the influence of key proteins of amyloid β -formation on the structural plasticity of dendritic spines was investigated in corresponding animal models. (1) Contrary to previous observations in adult animals, the loss of amyloid precursor protein had no impact on dendritic spines in the somatosensory cortex of juvenile mice. (2) The transgenic overexpression of human wild-type presenilin1, which functions as the catalytic subunit of the γ -secretase complex, or overexpression of a mutated variant of presenilin1, that is associated with a familial form of Alzheimer's disease, resulted in an increased spine density. Whereas the processing of candidate substrates of the γ -secretase was unaltered, the cellular Calcium homeostasis seemed to be impacted by presenilin1 overexpression, giving a possible explanation for the spine effect. (3) The genetic knockout of β -Secretase BACE1 had no influence on the density and the kinetics of dendritic spines in the cortex of adult mice. However *ex vivo* analysis of juvenile BACE1-deficient mice suggested a physiological role of the protein in the formation of spines. Interestingly, the pharmacological inhibition of BACE1 resulted in a decreased density of dendritic spines that was attributed to a reduced formation of spines. The here presented findings therefore highlight physiological functions of key proteins of Alzheimer's disease on synaptic structures, that have to be considered in designing and testing therapeutic strategies.

3 Einleitung

3.1 Die strukturelle Plastizität

3.1.1 Die Biologie von Lernen und Gedächtnis

„Persönlichkeit kommt nur intelligenten Akteuren zu, die zu einem Gesetz fähig sind, sowie zu Glück und Leiden. Diese Persönlichkeit erstreckt sich über ihre gegenwärtige Existenz hinaus in die Vergangenheit, allein durch das Bewusstsein, wodurch sie ihre eigenen, früheren Handlungen betreffen, und sie für diese verantwortlich ist, und diese zu ihr gehören und ihr zugeschrieben werden.“ (Original: *„[Person] ...belongs only to intelligent agents, capable of a law, and happiness and misery. This personality extends itself beyond present existence to what is past, only by consciousness, whereby it becomes concerned and accountable, owns and imputes to itself past actions.“*) (Locke, 1690) Mit diesem Satz verdeutlicht der Philosoph und Vordenker der Aufklärung John Locke in seinem „Ein Versuch über den menschlichen Verstand“, dass zum Wesen eines Menschen die Reflektion mit dem Vergangenen gehört, dass diese Erfahrungen die Persönlichkeit eines Menschen ausmachen. Einsichtig wird dieser Umstand auch, wenn man beispielsweise bei der Alzheimerschen Erkrankung beobachtet, wie der Verlust dieser lebenslangen Erfahrungen zu einem Verlust der Persönlichkeit führt. Die erste beschriebene Alzheimer Patientin Auguste Deter hat diesen Verfall der eigenen Identität treffend mit den Worten *„Ich habe mich sozusagen selbst verloren“* zusammengefasst.

Gegenüber der Tierwelt zeichnet den Menschen aus, dass er sich selbst bewusst erlebt und über sich selbst reflektieren kann. Demgegenüber sind die Fähigkeiten, Informationen aus der Umwelt wahrzunehmen, mit bereits bestehenden Erinnerungen abzugleichen und über Zeiträume abzuspeichern, die teilweise ein ganzes Leben andauern, sowohl Menschen als auch Tieren eigen. Auf diese Weise können auch Tiere Zusammenhänge erlernen und ihr Verhalten den Bedingungen der äußeren Welt anpassen. Kodiert werden die Lerninhalte von den Neuronen, den Nervenzellen, des zentralen Nervensystems. Die Anordnung der verschiedenen Subtypen von Neuronen im Nervensystem ist genetisch klar determiniert. Dagegen sind die individuellen Verschaltungen der einzelnen Nervenzellen untereinander im neuronalen Netzwerk sehr flexibel und können moduliert werden.

Mit dem zunehmend naturwissenschaftlichen Versuch, mentale Phänomene wie Lernen und Gedächtnis zu verstehen, wurde zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts das Konzept des Engramms entwickelt. Ein Engramm ist das physikalische Korrelat einer konkreten erlernten Information, welches das Erinnern dieser Information erlaubt (Lashley, 1950). Der spanische Neuroanatom Santiago Ramón y Cajal hatte bereits im ausgehenden 19. Jahrhundert postuliert, dass der Kontaktstelle zwischen den Neuronen, der Synapse, eine wichtige Rolle bei der Speicherung von Erfahrungen zukommt (Ramón y Cajal, 1893). Mit der nach ihm benannten Hebb'schen Lernregel „*what fires together, wires together*“ (verkürzt) formulierte schließlich Donald O. Hebb das Prinzip der synaptischen Plastizität (Hebb, 1949), welches bis heute als Grundlage für das Verständnis von Lernen und Gedächtnis gilt. Danach sind Synapsen veränderbar und je häufiger zwei Neurone gleichzeitig aktiv sind, umso effizienter wird der synaptische Kontakt zwischen diesen beiden Neuronen. Hebb vermutete außerdem, dass eine Erinnerung nicht an einer Synapse kodiert wird, sondern sich über einen Zellverband erstreckt, der verteilt über das neuronale Netzwerk lokalisiert ist (Hebb, 1949). Ein Engramm kann damit als eine Gedächtnisspur im Netzwerk verstanden werden, als eine verzweigte Bahnung neuronaler Aktivität, die einem spezifischen Lerninhalt entspricht.

3.1.2 Die synaptische Plastizität

Die 10^{12} Neurone des menschlichen Gehirns bilden mit schätzungsweise 10^{15} Synapsen ein höchst komplexes Netzwerk (Ho *et al.*, 2011). Während neuronale Informationen innerhalb einer Nervenzelle durch elektrische Signale weitergeleitet werden, dienen Neurotransmitter zur transneuronalen chemischen Kommunikation. Daher zeichnet sich eine Synapse durch eine axonale Präsynapse, von der die Neurotransmitter ausgeschüttet werden, der dendritischen Postsynapse als Empfangseinheit und dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt aus (Abbildung 1).

Mit ihren elektrophysiologischen Messungen am visuellen System von Katzen konnten David H. Hubel und Torsten N. Wiesel zeigen, dass Neurone grundsätzlich plastisch auf Veränderungen des sensorischen Inputs reagieren (Hubel und Wiesel, 1970). Den endgültigen experimentellen Beleg für die von Hebb postulierte synaptische Plastizität gelang Tim V. Bliss und Terje Lømo mit der Etablierung der Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP) (Bliss und Lømo, 1973). Sie beobachteten, dass eine hochfrequente Stimulation von Nervenfasern, die in den Hippocampus projizieren, zu einer erhöhten Antwort der nachgeschalteten Neurone führt, die zeitlich auch über die initiiierende Stimulation hinaus bestehen bleibt. Die synaptische Übertragung wurde nachhaltig verstärkt. Demgegenüber resultiert bei der Langzeit-Depression (*long-term depression*, LTD) die verminderte Stimulation einer Synapse in deren anhaltender Schwächung (Siegelbaum und Kandel, 1991). LTP und LTD sind Standardmodelle, um mittels Elektrophysiologie die synaptische Plastizität zu untersuchen. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Lernen und Gedächtnis lieferte schließlich Eric Kandel mit seinen Studien an der Meeresschnecke *Aplysia californica*. Anhand eines einfachen Reflexes konnte er in diesem relativ einfachen Organismus die Gedächtnisbildung im

intakten Nervensystem verfolgen und detaillierte zelluläre und molekulare Mechanismen aufklären (Kandel, 2001). Tatsächlich konnte an diesem Modellsystem auch beschrieben werden, dass diese Art von Lernen mit strukturellen Modifikationen, genauer mit einer veränderten Anzahl an Synapsen, verbunden ist (Bailey und Chen, 1988). Interessanterweise korrelierte die Präsenz dieser strukturellen Veränderungen der Synapsen mit dem Zeitverlauf des erlernten Verhaltens (Bailey und Chen, 1989).

3.1.3 Dendritische Spines

Bei seinen lichtmikroskopischen Untersuchungen von Golgi-gefärbtem Gehirngewebe entdeckte Ramón y Cajal 1888 kleine, dornenartige Fortsätze an den neuronalen Dendriten, die er als „espinas“, als Spines bezeichnete (Ramón y Cajal, 1888). Dendritische Spines stellen das postsynaptische Kompartiment glutamaterger Synapsen dar. Sie haben typischerweise eine Größe von 0,5-2µm und lassen sich aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie mithilfe mikroskopischer Methoden sehr gut analysieren. In ultrastrukturellen Aufnahmen zeichnet sich innerhalb der Spines als proteinreiche, elektronendichte Struktur die Postsynaptische Dichte (*postsynaptic density*, PSD) ab, die gegenüber der aktiven Zone der Präsynapse liegt und sich aus den Neurotransmitter-Rezeptoren, signalvermittelnden Proteinen und Strukturproteinen zusammensetzt (Sheng und Hoogenraad, 2007). Das Zytoskelett der Spines besteht hauptsächlich aus Actin-Filamenten (Hotulainen und Hoogenraad, 2010). In beziehungsweise assoziiert mit dendritischen Spines finden sich außerdem endo- und exozytotische Bereiche (Newpher und Ehlers, 2009), Mitochondrien (Li *et al.*, 2004), Polyribosomen (Ostroff *et al.*, 2002) und Endoplasmatisches Retikulum (Segal *et al.*, 2010b) (Abbildung 1).

Aber welche Funktion hat dieses Mikrokompartment dendritischer Spine? Warum werden die Synapsen nicht direkt am Dendriten ausgebildet? Rafael Yuste fasste die unterschiedlichen Erklärungsansätze zusammen, die seiner Meinung nach einer gemeinsamen Grundidee folgen. Demnach ist das neuronale Netzwerk möglichst (1) verteilt, (2) integrierend und (3) plastisch gestaltet (Yuste, 2011). (1) Der lange, parallele Verlauf von exzitatorischen Axonen und das weit verzweigte Dendritensystem mit den Spines gewährleisten, dass möglichst viele Neurone miteinander Kontakt haben (Chklovskii *et al.*, 2002). Außerdem können sich Spines strecken und so den Kontaktradius zu benachbarten Axonen deutlich ausdehnen (Stepanyants *et al.*, 2002). (2) Um eine Überlagerung der verschiedenen eingehenden synaptischen Signale zu verhindern, sollten diese Signale isoliert vom postsynaptischen Neuron registriert und dann integriert werden (Cash und Yuste, 1998). Einzelne Spines könnten daher als isoliertes elektrisches Kompartiment mit dem dünnen Spine-Hals als elektrischer Widerstand fungieren. (3) Als isolierte biochemische Kompartimente könnten außerdem Veränderungen spezifisch an den Spines realisiert werden, die aufgrund eines Stimulus aktiv waren. Während benachbarte Spines unbeeinflusst waren, erhöhte sich in aktivierten Spines beispielsweise die Konzentration des Botenstoffs Calcium (Ca^{2+}), der bei der synaptischen Plastizität eine zentrale Rolle spielt (Yuste und Denk, 1995).

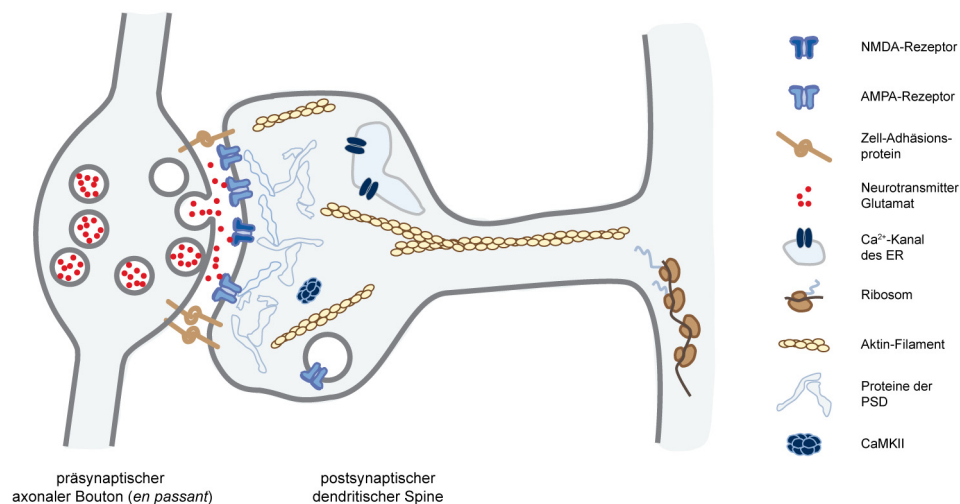


Abbildung 1. Synaptische Plastizität am dendritischen Spine. Aktionspotentiale des präsynaptischen Neurons führen im axonalen Bouton zum Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, was die exozytotische Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat zur Folge hat. Auch für die präsynaptische Seite wurden Mechanismen der Plastizität beschrieben, auf die hier allerdings nicht weiter eingegangen werden soll. Bindung von Glutamat an die ionotropen AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) - Rezeptoren führt zur Depolarisation der postsynaptischen Membran und damit zur Wandlung des chemischen Neurotransmitter-Signals in ein elektrisches Signal. Die NMDA (N-Methy-D-Aspartat) - Rezeptoren werden ebenfalls durch Glutamat aktiviert und ermöglichen im Gegensatz zu den AMPA-Rezeptoren den Einstrom von Ca^{2+} . Als sogenannter Hebbischer Koinzidenzdetektor öffnen diese Ionenkanäle aber nur, wenn zusätzlich die postsynaptische Membran depolarisiert ist, das heißt, wenn Prä- und Postsynapse gleichzeitig aktiv sind, wie bei der LTP. Im dendritischen Spine bewirkt der Botenstoff Ca^{2+} eine Reihe von Veränderungen, die die Stärke der Postsynapse auf zukünftige Aktivierungen modifizieren. Zum Beispiel wird die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasell (CaMKII) aktiviert, die sich durch Autophosphorylierung über längere Zeit selbst aktiv hält und die Anzahl der AMPA-Rezeptoren durch Endozytose erhöht. Phosphorylierungen der Glutamat-Rezeptoren selbst und von Strukturproteinen wie Stargazin können ebenfalls die synaptische Stärke modulieren. Weitere Strukturproteine, wie PSD95, Homer und Shank organisieren die postsynaptischen Rezeptoren und ein komplexes System aus Signalproteinen. Zusammen bildet dieses dichte Proteinnetzwerk die postsynaptische Dichte. Zell-Adhäsionsproteinen wie N-Cadherin, Integrin, Neurexin/Neuregulin oder Ephrin/Ephrin-Rezeptor wird ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Regulation der synaptischen Plastizität zugesprochen. Form, Beweglichkeit und Stabilität des dendritischen Spines werden durch ein flexibles und regulierbares Aktin-Zytoskelett gewährleistet. Für langanhaltende postsynaptische Veränderungen, die die Realisierung eines Langzeitgedächtnisses erlauben, sind Transkription und Translation essentiell und eine Vielzahl aktivitätsregulierter Gene wurde bereits beschrieben. Der dendritische Transport von mRNA und die lokale Translation stellen dabei eine Möglichkeit dar, wie Veränderungen spezifisch an den vorher aktivierten Synapsen verwirklicht werden könnten. Dementsprechend finden sich an Spines oder Spine-assoziiert auch Polyribosomen. Da Ca^{2+} von zentraler Bedeutung für die synaptische Plastizität ist, wird der Ca^{2+} -Haushalt im Kompartiment Spine sensibel reguliert. Als zellulärer Speicher für Ca^{2+} finden sich in Spines daher Ausläufer des endoplasmatischen Retikulums (ER), die als Spine-Apparat bezeichnet werden und mit Ca^{2+} -Kanälen wie dem Ryanoidin-Rezeptor ausgestattet sind. (Calabrese *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2011; Segal, 2010a; Segal *et al.*, 2010b; Tada und Sheng, 2006)

Von den typischen dendritischen Spines müssen die Filopodien unterschieden werden, die eine Vorstufe der Spines darstellen und daher vor allem während der Spinogenese der frühen postnatalen Entwicklung zu finden sind. Mit bis zu 10µm Länge sind Filopodien dünne und sehr flexible Fortsätze, die eine Lebensdauer von Minuten bis Stunden haben und typischerweise keine PSD aufweisen (Dailey und Smith, 1996; De Roo *et al.*, 2008). Funktionell initiieren Filopodien den Kontakt zu Axonen und können dann zu synapsen-bildenden Spines konvertieren (De Roo *et al.*, 2008; Marrs *et al.*, 2001; Ziv und Smith, 1996). Dieser Prozess ist sehr selektiv, da während der Entwicklung nur etwa ein Prozent der Filopodien als Spines stabilisiert werden (Zuo *et al.*, 2005a). Im Kortex adulter Mäusen machen Filopodien nur noch zwei bis drei Prozent der dendritischen Fortsätze aus (Zuo *et al.*, 2005a).

Die dendritischen Spines unterscheiden sich in ihrer Form und wurden diesbezüglich grob in drei Klassen eingeteilt: *thin* (dünne), *stubby* (stämmige) und *mushroom* (pilzförmige) Spines (Harris *et al.*, 1992; Peters und Kaiserman-Abramof, 1970). *Thin* Spines besitzen relativ zu ihrem Hals und ihrer Länge einen kleinen Kopf. Demgegenüber haben *mushroom* Spines einen voluminösen Kopf auf einem sehr dünnen Hals. Die *stubby* Spines zeichnen sich durch eine ähnliche Breite wie Länge aus, besitzen allerdings keinen Hals. In ihrer Form und in ihrem Auftreten sind dendritische Spines sehr dynamische Strukturen und Veränderungen konnten in Abhängigkeit von Lernvorgängen, aber auch unter pathologischen Bedingungen beobachtet werden (Bhatt *et al.*, 2009). Bevor auf die dynamischen Veränderungen der dendritischen Spines detailliert eingegangen werden kann, muss im Folgenden zuerst die Methode vorgestellt werden, die derartige Untersuchungen erlaubt: die Zwei-Photonen-Mikroskopie.

3.1.4 Die Zwei-Photonen-Mikroskopie

Seit Ramón y Cajal auf der Basis seiner lichtmikroskopischen Untersuchungen auf Grundprinzipien der Funktionsweise von Nervenzellen schließen konnte (Ramón y Cajal, 1893), ist die Mikroskopie zu einem wichtigen Werkzeug bei der Beschreibung neurobiologischer Prozesse geworden. Optimal sollten die Neurone dabei in funktionalem Zustand, in ihrer natürlichen Umgebung und zeitabhängig beobachtet werden. Die Zwei-Photonen Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskopie (kurz Zwei-Photonen Mikroskopie) (Denk *et al.*, 1990) ermöglicht derartige Untersuchungen, da fluoreszenzmarkierte biologische Strukturen im Submikrometer-Bereich bis zu einer Gewebetiefe von einem Millimeter in lebenden Tieren repetitiv aufgenommen werden können. Das Grundprinzip dieser Methode beruht auf der nichtlinearen Anregung des Fluorophors, bei der zwei energieärmere Photonen in Kooperation den angeregten Zustand des Fluorophors induzieren (Abbildung 2A). Dabei werden drei Vorteile gegenüber der konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopie genutzt (Svoboda und Yasuda, 2006): (1) Das längerwellige Anregungslicht penetriert biologisches Gewebe besser, da es weniger stark absorbiert und weniger stark gestreut wird. (2) Da der Zwei-Photonen-Effekt stark von der Häufigkeit der kooperierenden Photonen abhängt, findet die Fluoreszenzanregung fast ausschließlich im Fokusbereich statt. (3) Aus letzterem resultiert auch,

dass das gesamte Emissionslicht, sowohl nicht gestreutes als auch gestreutes, detektiert werden kann und zum Signal beiträgt. In der Summe bedeutet dies, dass die Wahrscheinlichkeit, ein emittiertes Photon pro Anregungsereignis zu detektieren, erhöht wird. Somit kann der Energiebetrag, der fokussiert in die biologische Probe hineingestrahlt wird, niedrig gehalten werden, was der sogenannten Phototoxizität und dem *bleaching* vorbeugt (Svoboda und Yasuda, 2006). Im Aufbau unterscheidet sich ein Zwei-Photonen-Mikroskop nicht wesentlich von einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Abbildung 2B). Allerdings werden modulierbare Puls laser mit einem typischen Anregungsspektrum von 700-1000nm eingesetzt und auf die Lochblende (*pinhole*) kann verzichtet werden.

Für die Fluoreszenz-Mikroskopie müssen die biologischen Strukturen, die untersucht werden sollen, markiert sein. Synthetische Farbstoffe, die *per se* die Zellmembran passieren (Garaschuk *et al.*, 2006; Nimmerjahn *et al.*, 2004) oder direkt in die Zielzellen injiziert werden (Svoboda *et al.*, 1997), eignen sich für die Zellmarkierung bei kurzzeitigen *in-vivo* mikroskopischen Experimenten. Außerdem lassen sich mit solchen Farbstoffen beispielsweise auch Blutgefäße (Kleinfeld *et al.*, 1998) oder Proteinaggregate (Burgold *et al.*, 2011) im lebenden Tier darstellen (Abbildung 4). Vor allem für die chronische Zwei-Photonen-Mikroskopie hat sich der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Proteinen wie dem grün-fluoreszierenden Proteins (*green fluorescent protein*, GFP) oder Varianten dieses Proteins, die durch Punktmutationen spektral verändert wurden (XFPs), durchgesetzt. Die transgene Expression der XFPs unter Kontrolle des neuronenspezifischen Thy-1

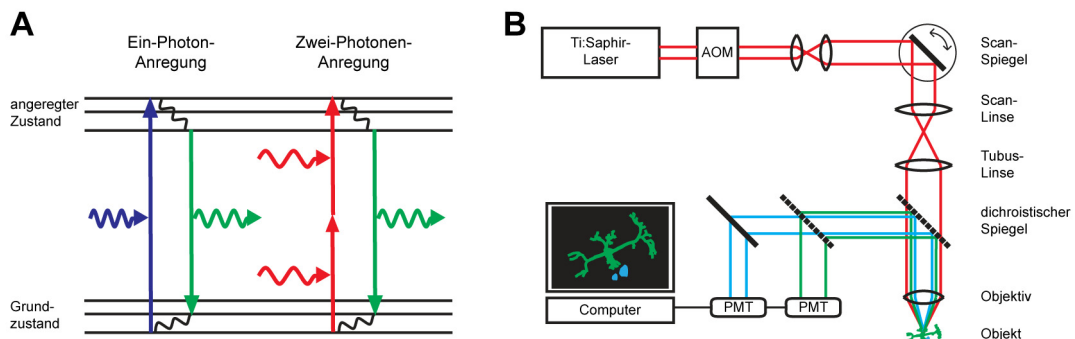


Abbildung 2. Prinzip der Zwei-Photonen-Mikroskopie. (A) Jablonski Diagramm zur Veranschaulichung der linearen (Ein-Photon-) und der nicht-linearen (Zwei-Photonen-) Anregung eines Fluorophors. Das Zwei-Photonen-Anregungsspektrum ist oft nicht aus der linearen Anregung vorherzusagen und sollte für jedes Fluorophor unter den entsprechenden Experimentbedingungen optimiert werden. (B) Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskops: Als Anregungsquelle eignen sich Titan:Saphir-Laser (Ti:Saphir-Laser), die Pulse im Femtosekundenbereich produzieren und sich über einen Wellenlängenbereich von etwa 700-1000nm einstellen lassen. Die Intensität der Anregungsstrahlung wird durch einen akustooptischen Modulator (AOM) reguliert. Der fokussierte Laserstrahl fährt das Objekt ab und das Emissionslicht wird zur Detektion mit den Photomultipliern (*photomultiplier tube*, PMT) geleitet. Da das Zwei-Photonen-Anregungsspektrum oft sehr breit ist, können mit einer Anregungswellenlänge unter Umständen mehrere Fluorophore simultan mikroskopiert werden. (Helmchen und Denk, 2005; Svoboda und Yasuda, 2006)

Promotors führt zu einer Markierung einzelner Neurone (Feng *et al.*, 2000), die als eine Art *in vivo* Golgi-Färbung verstanden werden kann. Entsprechend sind in den Mauslinien GFP-M und YFP-H (yellow (gelb) fluorescent protein, YFP) die Pyramidenzellen der kortikalen Schicht V und der Schicht II/III so sporadisch markiert, dass sich die dendritischen Spines und auch axonale Boutons einzelner Neurone abbilden lassen (Feng *et al.*, 2000) (Abbildung 3).

Neben den transgenen Mäusen können auch virale Vektorsysteme für die Expression von fluoreszierenden Proteinen eingesetzt werden. Diese können zeitlich und lokal variabel appliziert werden, wobei eine Beschränkung der Expression der Zielkonstrukte durch neuronenspezifische Promotoren (Dittgen *et al.*, 2004) oder durch das sogenannte *pseudotyping*, also die Ausstattung mit geeigneten viralen Oberflächenproteinen (Cronin *et al.*, 2005), realisiert werden kann. Für *in vivo* mikroskopische Experimente wurden virale Vektorsysteme beispielsweise zur Markierung neugeborener Neurone im Riechkolben (*Bulbus Olfactorius*) (Mizrahi, 2007) (Abbildung 4) und zur Detektion neuronaler Aktivität mithilfe von genetisch kodierten Ca^{2+} -Sensoren (Wallace *et al.*, 2008) oder aktivitätsabhängig exprimierten Reporterfluorophoren (Meyer-Luehmann *et al.*, 2009) eingesetzt. Um dendritische Spines *in vivo* zu mikroskopieren, wurden in Einzelfällen ebenfalls virale Vektoren verwendet (Lendvai *et al.*, 2000; Spires *et al.*, 2005). Diese Anwendung wurde aber durch die XFP-transgenen Tiere praktisch vollständig abgelöst.

Umstritten ist die Art, wie das Gehirn für die chronische transkraniale *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie optisch zugänglich gemacht wird. Bei der *open skull* Methode (offener Schädelknochen) wird über der gewünschten kortikalen Region ein im Durchmesser drei bis acht Millimeter großes Stück des Schädelknochens entfernt und durch ein Deckgläschen ersetzt (Fuhrmann *et al.*, 2007; Holtmaat *et al.*, 2009; Svoboda *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird ein optimaler optischer Zugang zu einem relativ großen Ausschnitt des Kortex gewährt, der Aufnahmen

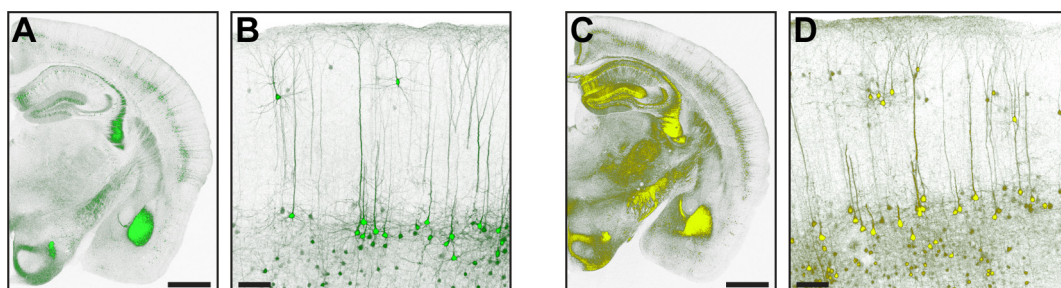


Abbildung 3. Fluoreszenzmarkierung von Neuronen in den Mauslinien GFP-M und YFP-H. Koronare Schnitte einer Hemisphäre zur Lokalisation fluoreszenzmarkierter Nervenzellen in der GFP-M- (A) und der YFP-H- (C) Linie. Neben einer relativ dichten Markierung hippocampaler Neurone sind kortikale Pyramidenzellen der Schicht II/III und der Schicht V vereinzelt gefärbt (in B) und (D) sind Regionen des somatosensorischen Kortex der jeweiligen Mauslinie vergrößert dargestellt. Dabei ist die Thy-1-kontrollierte Transgenexpression in der GFP-M-Linie spärlicher als in den YFP-H Tieren. Markant zeichnen sich die Projektionen in die Amygdala, das Striatum, den Thalamus und den Hypothalamus ab. (Maßstabsleiste: (A, C) 1mm, (B, D) 100µm)

bis zu einer Tiefe von 700-800µm erlaubt. Abhängig vom Operateur kann das kraniale Fenster über Wochen bis Monate klar bleiben und ermöglicht ein beliebig wiederholbares Mikroskopieren. Der operative Eingriff der Methode ist invasiv und induziert eine gliale Reaktion, die allerdings nach drei Wochen weitestgehend abgeklungen ist (Holtmaat *et al.*, 2009) (nicht publizierte Erfahrungswerte). Weniger invasiv ist die *thinned skull* Methode (ausgedünnter Schädelknochen), bei der der Schädel durch Bohren bis auf eine etwa 20µm dünne, durchsichtige Knochenschicht verschmälert wird (Grutzendler *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2010). Eine kleine mikroskopierfähige Fläche (typischerweise 0,1-0,3mm³) erlaubt allerdings nur sehr oberflächliche Aufnahmen des Kortex in einem Zeitraum von 24 Stunden. Für wiederholtes Mikroskopieren muss erneut gebohrt

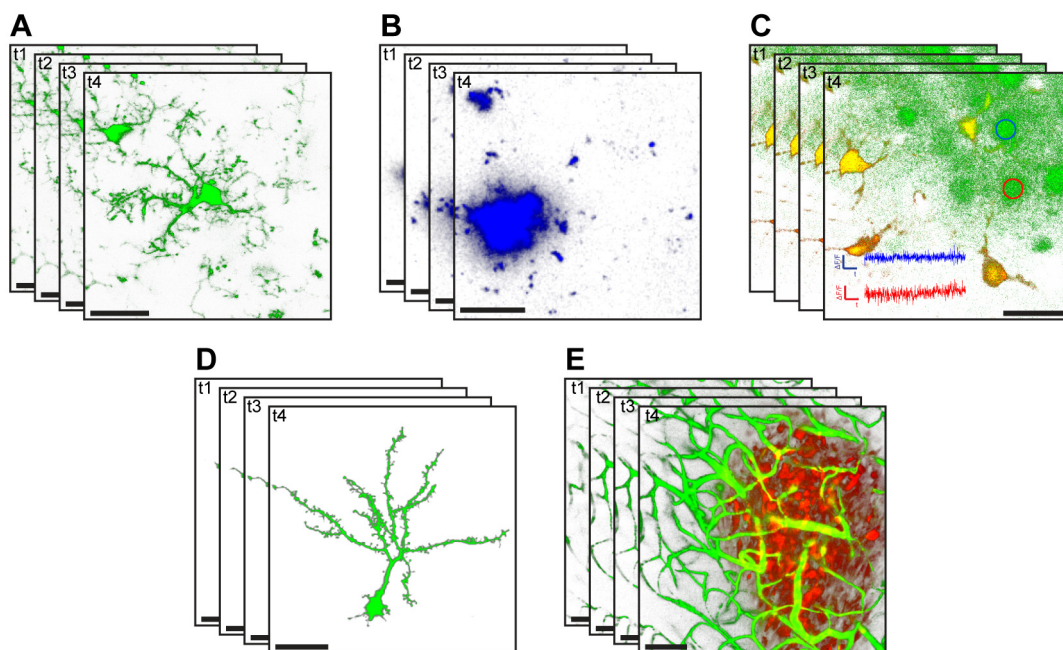


Abbildung 4. Anwendungsbeispiele für Zwei-Photonen-mikroskopische *in vivo* Experimente über mehrere Zeitpunkte. (A) Die transgene Expression von GFP unter der Kontrolle des Promotors des Fraktalkin-Rezeptor1 (CX3CR1) führt zu einer Markierung der Mikroglia, deren Kinetik mit der intravitralen Zwei-Photonen-Mikroskopie untersucht werden kann (Fuhrmann *et al.*, 2010). (Maßstabsleiste 20µm) (B) Die Bindung des Farbstoffs Methoxy-X04 an fibrilläre Proteinaggregate kann zur Beschreibung des Wachstums amyloider Plaques in Mausmodellen der Alzheimerschen Erkrankung eingesetzt werden (Burgold *et al.*, 2011). (Maßstabsleiste 50µm) (C) Veränderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration lassen sich in kortikalen Neuronen mit dem membrangängigen Indikator Oregon Green 488 messen (Garaschuk *et al.*, 2006). Zur Abgrenzung wurden Astrozyten zusätzlich mit Sulforhodamin 101 gefärbt (Nimmerjahn *et al.*, 2004). (Maßstabsleiste 20µm) (D) Die virale Markierung neugeborener Neurone erlaubt die Beobachtung des Einwanderns und der Integration von Nervenzellen in den *Bulbus Olfactorius* bei der adulten Neurogenese (Mizrahi, 2007). (Maßstabsleiste 50µm) (E) Tumorstadium im Gehirn und die resultierende Angiogenese lassen sich durch Fluoreszenzmarkierung der Glioblastom-Zellen mit RFP (*red fluorescent protein*) und der Blutgefäße mit Dextran-gekoppeltem Fluorescein untersuchen (von Baumgarten *et al.*, 2011). (Maßstabsleiste 100µm) (Bildmaterial bereitgestellt von und ein Danke an Kevin Keppler (A), Severin Filser (D) und David Brucker (E).)

werden, was häufig nur drei bis vier Mal gelingt. Allerdings kann der Abstand zwischen den Beobachtungszeitpunkten frei gewählt werden und damit durchaus im Rahmen von Monaten bis Jahren liegen (Holtmaat *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Eine Kombination der beiden Methoden, bei der der ausgedünnte Schädelknochen durch ein Deckgläschen stabilisiert wird, ermöglicht wiederholte Aufnahmen über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Allerdings werden auch hier hochaufgelöste Abbildungen nur innerhalb der oberen 100µm des Kortex erreicht (Drew *et al.*, 2010).

3.1.5 Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Können Lernvorgänge und sensorische Stimulation anatomische Veränderungen im Gehirn bewirken? In einer Magnetresonanztomographie (MRT)-Studie wurde bei Menschen, die das Jonglieren mit drei Bällen erlernten, in der Tat eine signifikante Zunahme der grauen Substanz im visuellen Kortex festgestellt (Draganski *et al.*, 2004). Auf der mikroskopischen Ebene der dendritischen Spines lassen sich zwei Formen von stimulationsabhängigen strukturellen Modifikationen im Mausgehirn beobachten. Spines können einerseits ihre Form und Größe ändern. Außerdem kann die Anzahl der dendritischen Spines verändert werden, indem neue Spines gebildet werden und etablierte Spines verloren gehen. Beide Phänomene werden unter dem Begriff der strukturellen Plastizität dendritischer Spines zusammengefasst und sollen im Folgenden näher erläutert werden. Die verzweigten Dendritenbäume selbst sind im adulten Gehirn stabil und verändern sich auch nach sensorischer Stimulation nicht (Mizrahi und Katz, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2002).

Eine lokalspezifische Stimulation einzelner Spines in organotypischen hippocampalen Gewebeschnitten mit photoaktivierbarem Glutamat oder mithilfe einer hochfrequenten Erregung der Präsynapse (LTP-Stimulation) führt zu einer Zunahme des Spine-Volumens, die NMDA-Rezeptor-abhängig und mit einem Umbau des Aktinzytoskeletts verbunden ist (Matsuzaki *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Umgekehrt kann die Induktion von LTD in einer Schrumpfung der dendritischen Spines resultieren, die anhaltend aber reversibel ist (Okamoto *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Die Größe der Spines korreliert dabei positiv mit der Anzahl an funktionellen AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Dichte (Matsuzaki *et al.*, 2001). Da eine Stimulation von *thin* Spines zu einer permanenten Vergrößerung des Spinevolumens führt (Matsuzaki *et al.*, 2004), wurde vermutet, dass diese Spines die flexiblen „lernenden Spines“ sind (Bourne und Harris, 2007). Bei den großen *mushroom* Spines dagegen ist die Volumenänderung eher transient (Matsuzaki *et al.*, 2004), sie sind stabiler und gelten daher als „erinnernde Spines“ (Bourne und Harris, 2007).

Auf der anderen Seite wurde ebenfalls in hippocampalen Gewebeschnitt-Kulturen gezeigt, dass eine Verminderung neuronaler Aktivität auch zu einem Verlust dendritischer Spines führen kann (Nägerl *et al.*, 2004) und dass die LTP-Stimulation auch eine *de novo* Ausbildung von Spines bedingen kann (Engert und Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic *et al.*, 1999; Nägerl *et al.*, 2004).

Diese neuen Spines bilden ohne filipodiale Vorstufe innerhalb von Minuten einen physikalischen Kontakt zu Präsynapsen aus und entwickeln in einem Zeitraum von 15 bis 19 Stunden alle ultrastrukturellen Merkmale einer synaptischen Verbindung (Nägerl *et al.*, 2007).

In vivo wurde die strukturelle Plastizität dendritischer Spines in kortikalen Regionen adulter Mäuse das erste Mal 2002 von den Laboren um Karel Svoboda und Wen-Biao Gan unabhängig voneinander beschrieben (Grutzendler *et al.*, 2002; Trachtenberg *et al.*, 2002) (Abbildung 5). Während in der postnatalen Entwicklung noch ein hoher Umbau des neuronalen Netzwerkes stattfindet und die Mehrheit der Spines eine kurze Lebensdauer hat (Holtmaat *et al.*, 2005), sind Spines im adulten Gehirn unter Kontrollbedingungen relativ stabil. So bleiben 70% der Spines im muren Kortex über einen Zeitraum von 18 Monate bestehen (Grutzendler *et al.*, 2002; Zuo *et al.*, 2005a). Entsprechend ihrer Lebensdauer können transiente und persistente Spines unterschieden werden. Als transient werden Spines bezeichnet, wenn sie für weniger als acht Tage stabil sind (Holtmaat *et al.*, 2005). Dendritische Spines, die wenigsten acht Tage bestehen, sind in der Regel auch für sehr viel längere Zeiträume stabil und werden daher als persistent klassifiziert (Holtmaat *et al.*, 2005). Transiente Spines sind eher klein, während persistente Spines gewöhnlich größer und typischerweise *mushroom*-förmig erscheinen (Holtmaat *et al.*, 2005; Majewska *et al.*, 2006). Eine elektronenmikroskopische Studie *in vivo* mikroskopierter Spines bestätigte, dass erst die persistenten Spines Teil einer funktionell erscheinenden Synapse sind (Knott *et al.*, 2006).

Unter dem englischsprachigen Schlagwort *experience-dependent* (erfahrungsabhängig) wurde eine Vielzahl Zwei-Photonen-mikroskopischer Studien publiziert, die durch sensorische Manipulation die strukturelle Plastizität dendritischer Spines beeinflussen. Das Stutzen der Schnauzhaare (Vibrissen) von Mäusen (Holtmaat *et al.*, 2006; Trachtenberg *et al.*, 2002; Wilbrecht *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2005) und eine Verminderung visueller Reize durch Verschließen eines Auges (Hofer *et al.*, 2009), Aufzucht in Dunkelheit (Tropea *et al.*, 2010) oder Zerstörung eines Retinabereichs (Keck *et al.*, 2008) führen zu substantiellen Veränderungen der Spine-Dynamiken in den korrespondierenden kortikalen Regionen, dem somatosensorischen und dem visuellen Kortex. Dabei konnte vor allen Dingen ein erhöhter Umsatz an dendritischen Spines beobachtet werden, der dauerhafte strukturelle Veränderungen nach sich zog. Allerdings bleibt fraglich, inwieweit ein solcher adaptiver Umbau der synaptischen Verbindungen nach einem unphysiologischen Verlust sensorischer Stimulation als Modell für Lernen und Gedächtnis gelten kann. Vier neuere *in vivo* Studien haben daher den Einfluss spezifischer Lernaufgaben auf dendritische Spines untersucht (Fu *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Beispielsweise führt das Erlernen einer bestimmten Greifübung oder des Balancierens auf einem rotierenden Zylinder zur schnellen Ausbildung von Spines im murinen Motorkortex, wobei der Lernerfolg mit der Anzahl der neuen Spines korreliert (Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Wiederholtes Training unterstützt die neuentstandenen Spines, die über Monate stabil bleiben können und deren Überleben mit dem Erhalt der erlernten Fähigkeit assoziiert ist (Xu *et al.*, 2009). Dendritische Spines stellen daher tatsächlich ein physikalisches Korrelat für Erinnerungen dar und das Erlernen neuer Fähigkeiten ist mit der *de novo* Bildung neuer Spines verbunden. Verglichen mit der Modulation der Stärke bereits existierender Synapsen, kann

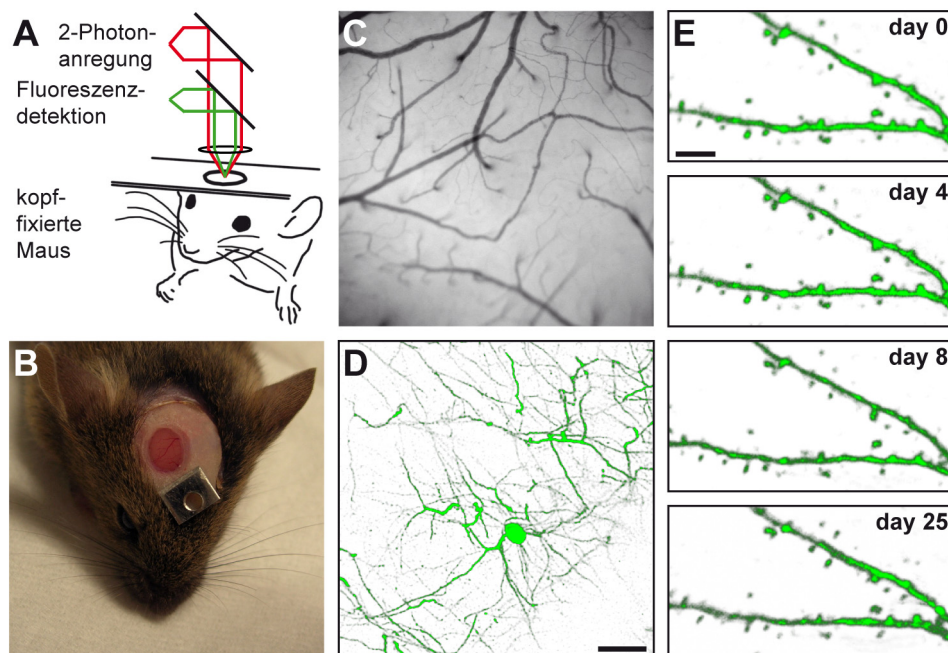


Abbildung 5. In vivo Zwei-Photonen-Mikroskopie dendritischer Spines im murinen Kortex. (A) Schematische Darstellung eines *in vivo* Zwei-Photonen-Experiments. (B) Kraniales Fenster (mit der *open skull*-Präparation) über dem somatosensorischen Kortex. Das mit Dentalzement befestigte Metallplättchen mit Gewinde dient der Fixierung der anästhesierten Maus unter dem Mikroskop. (C) Anhand des charakteristischen Musters der oberflächlichen Blutgefäße lassen sich definierte Positionen grob wiederfinden. (D) Z-Projektion einer *in vivo* mikroskopierte Übersichtsaufnahme kortikaler Dendriten einer YFP-H Maus. Innerhalb solcher Übersichten lassen sich die definierten Dendritenabschnitte während eines repetitiven Mikroskopierens lokalisieren. (Maßstabsleiste 25µm) (E) Zeitserie eines fluoreszenzmarkierten Dendriten mit den charakteristischen dendritischen Spines. Mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie können einzelne dendritische Spines in ihrer natürlichen, funktionellen Umgebung beobachtet und strukturelle Veränderungen an denselben Dendritenabschnitten über Zeiträume von Tagen bis Monaten verfolgt werden. (Maßstabsleiste 5µm)

die Neubildung synaptischer Verbindungen die Speicherkapazität eines neuronalen Netzwerkes deutlich erhöhen (Chklovskii *et al.*, 2004). Als nächsten Schritt gilt es nun, die beobachteten morphologischen Spine-Phänomene mechanistisch eingehend zu charakterisieren. Mithilfe pharmakologischer Manipulation und transgener Mäuse konnte in ersten Ansätzen gezeigt werden, dass der aktivitätsabhängige Verlust von Spines über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Zuo *et al.*, 2005) und dass die CaMKII wesentlich für die Stabilisierung neuer Spines ist (Wilbrecht *et al.*, 2010).

Zur strukturellen Plastizität von Axonen und axonalen Boutons, die in *en passant* Boutons entlang des Axons und abzweigende terminale Boutons unterteilt werden (De Paola *et al.*, 2006), ist weniger bekannt. Die axonalen Verzweigungen sind unter Kontrollbedingungen relativ stabil (De Paola *et al.*, 2006), sensorische Manipulation kann allerdings zu Rückzug oder dem Anwachsen ganzer Axonzweige führen (Marik *et al.*, 2010; Yamahachi *et al.*, 2009). Die Boutons selbst sind

ebenfalls flexibel und eine elektrische oder eine sensorische Stimulation resultiert in Verlust und Neubildung dieser axonalen Strukturen (Becker *et al.*, 2008; Keck *et al.*, 2011). Somit können auch strukturelle Veränderungen axonaler Boutons zur funktionalen Plastizität des neuronalen Netzwerks beitragen.

1947 berichtete Donald O. Hebb, dass Ratten, die er als Haustiere hielt, bei Lerntests besser abschnitten als Ratten, die in seinem Labor in Standardkäfigen gehalten wurden (Hebb, 1947). Er schlug damit das *Enriched Environment* (reizangereicherte Umgebung; auch *Environmental Enrichment*) als experimentelles Konzept vor, das seit den Arbeiten von Mark Rosenzweig Einzug in den wissenschaftlichen Alltag gefunden hat (Rosenzweig *et al.*, 1962). Als *Enriched Environment* wird die Kombination aus erhöhter sensorischer, kognitiver und motorischer Stimulation von Versuchstieren bezeichnet und beinhaltet standardmäßig einen größeren Käfig mit einer Vielzahl unterschiedlicher und wechselnder Spielmaterialeien, sowie soziale Interaktion und Möglichkeiten zu freier Bewegung (van Praag *et al.*, 2000). Die Haltung im *Enriched Environment* vermindert die neuropathologischen Auswirkungen bei Mausmodellen für Gehirntraumata (Kolb und Gibb, 1991) oder neurodegenerative Erkrankungen, wie der Alzheimerschen Erkrankung oder dem Morbus Parkinson (Bezard *et al.*, 2003; Lazarov *et al.*, 2005). Ein *Enrichment* beeinflusst die Genexpression (Fischer *et al.*, 2007), erhöht die adulte hippocampale Neurogenese (Kempermann *et al.*, 1997) und verändert das Gewicht des Gehirns (Bennett *et al.*, 1969) und den Verzweigungsgrad von Dendriten (Greenough *et al.*, 1973). In *ex vivo* Analysen verschiedener Hirnregionen, einschließlich des somatosensorischen Kortex, wurde auch eine erhöhte Dichte dendritischer Spines beobachtet (Gelfo *et al.*, 2009; Kolb *et al.*, 2003; Leggio *et al.*, 2005). Die generelle sensorische Stimulation durch ein *Enriched Environment* auf Spines und ihre Dynamik *in vivo* ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

3.2 Die Alzheimersche Erkrankung

3.2.1 Die Krankheit

1907 veröffentlichte der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer seine Beschreibung der 51-jährigen Patientin Auguste Deter, die „...zeitlich und örtlich gänzlich desorientiert“ und deren „...Merkfähigkeit ... aufs schwerste gestört“ war (Alzheimer, 1907). Der Verlauf der Krankheit, deren Namensgeber Alzheimer werden sollte, war progressiv und nach dem Tod der Patientin stellte dieser fibrilläre Ablagerungen im Gehirn fest, die er für den Untergang von Nervenzellen verantwortlich machte (Abbildung 6) (Alzheimer, 1907).

Etwa 100 Jahre später stellt die Alzheimersche Erkrankung die Gesellschaft und die weltweiten Gesundheitssysteme vor ein ernstzunehmendes Problem. Die Krankheit ist die häufigste Ursache für eine Demenzerkrankung mit aktuell geschätzten 22 Millionen Betroffenen weltweit (Prince *et al.*, 2011), 850.000 sind es allein in Deutschland (Sütterlin *et al.*, 2011). Aufgrund des demographischen Wandels könnten sich diese Zahlen bis zum Jahr 2050 verdreifachen. Die Kosten, die 2010 global durch Demenzerkrankungen entstanden sind, betrugen 604 Milliarden US-Dollar

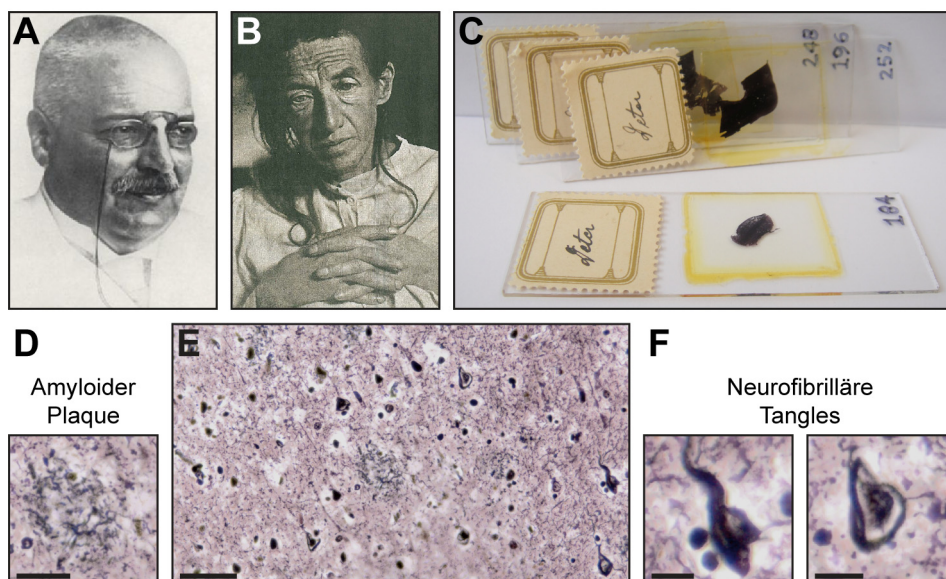


Abbildung 6. „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“. (A) Alois Alzheimer und (B) dessen Patientin Auguste Deter, an der die Alzheimersche Erkrankung erstmalig beschrieben wurde (Alzheimer, 1907). (C) Originale Präparate von Auguste Deter, die 1997 am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München wiedergefunden wurden (Graeber, 1999) und die von Professor Hans Kretzschmar für individuelle Aufnahmen zur Verfügung gestellt wurden. (D-F) Eigenhändige Aufnahme der historischen Bielschowsky Silberfärbungen von Alois Alzheimer. In der Übersichtsaufnahme (E) zeichnen sich die beiden histopathologischen Charakteristika der Alzheimerschen Erkrankung ab, die extrazellulären neuritischen Plaques (die Alzheimer ursprünglich als „miliare Herdchen“ bezeichnete) (D) und die im neuronalen Zellkörper eingeschlossenen neurofibrillären Tangles (F). (Maßstabsleisten: (D) 10µm, (E) 25µm, (F) 5µm)

und entsprechen damit mehr als einem Prozent des Weltsozialproduktes (Prince *et al.*, 2011). Hinzu kommen die dramatischen persönlichen und familiären Schicksale jedes einzelnen Falles.

Die Alzheimersche Erkrankung zeichnet sich durch einen fortschreitenden Verlust kognitiver Fähigkeiten aus, der in einem durchschnittlichen Verlauf von sieben bis zehn Jahren über einem progressiven Verlust der Persönlichkeit und der Fähigkeit zu alltäglichen Handlungen schließlich zum Tod führt (Holtzman *et al.*, 2011). Makroskopisch wird die Krankheit durch eine massive Hirnatrophie verursacht, die auf den Verlust von Nervenzellen, besonders in kortikalen und hippocampalen Regionen, zurückzuführen ist (Holtzman *et al.*, 2011). Die beiden neuropathologischen Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung, die ursächlich mit der Neurotoxizität in Verbindung gebracht werden, sind die amyloiden Plaques und die neurofibrillären Tangles (Abbildungen 6 und 7). Amyloide Plaques sind extrazelluläre Proteinaggregate, die vorrangig aus dem Amyloid- β -Peptid ($A\beta$ -Peptid) bestehen (Glennner und Wong, 1984). Oft lagern sich $A\beta$ -Aggregate auch an Blutgefäße an, welches als cerebrale Amyloidangiopathie bezeichnet wird (Mandybur, 1975). Die intrazellulären neurofibrillären Tangles werden aus hyperphosphoryliertem, aggregiertem Protein Tau gebildet (Wischik *et al.*, 1988), dessen physiologische Funktion in der Stabilisierung von Mikrotubuli liegt. Da neurofibrilläre Tangles ein charakteristisches Verteilungsmuster im Gehirn von Alzheimer Patienten aufweisen, welches mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert, konnte die Einteilung der Alzheimer-Stadien nach Braak eingeführt werden (Braak und Braak, 1991). Die neuropathologischen Veränderungen in Form von Plaques und Tangles setzen nach Schätzungen allerdings schon 10-20 Jahre vor den ersten klinischen Symptomen ein (Jack *et al.*, 2010).

Bis auf wenige autosomal-dominant vererbte Varianten (*familial Alzheimer's disease*, FAD) setzt der symptomatische Verlauf der Krankheit bei den Betroffenen typischerweise ab einem Alter von 65 Jahren ein. Allerdings verdoppelt sich die Krankheitshäufigkeit alle fünf Jahre (Ferri *et al.*, 2005) und macht damit das Alter zum Hauptrisikofaktor. Als weitere Risikofaktoren gelten Kopfverletzungen (Sundstrom *et al.*, 2007) und Schlaganfälle (Savva und Stephan, 2010). Lebensgewohnheiten wie Bildung und kognitive Auslastung, körperliche Aktivität, der Body-Mass-Index, Alkoholkonsum und Rauchen sind ebenfalls mit der Alzheimerschen Erkrankung assoziiert (Lee *et al.*, 2010b; Valenzuela und Sachdev, 2006). Schließlich wird bei der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit der Einfluss genetischer Faktoren auf 50-70% geschätzt. Beispielsweise kann eine Variante des Apolipoprotein E (ApoE) das Risiko für die Erkrankung um das 15-fache erhöhen (O'Brien und Wong, 2011; Reiman *et al.*, 2009).

3.2.2 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Mit der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (kurz Amyloid-Hypothese) versuchten die Wissenschaftler um John A. Hardy und Dennis J. Selkoe 1991/1992, die molekularen Ursachen der Alzheimerschen Erkrankung zusammenzufassen (Hardy und Allsop, 1991; Hardy und Higgins, 1992; Selkoe, 1991).

Nach dieser Hypothese ist die Ablagerung des A β -Peptids, dem Hauptbestandteil der amyloiden Plaques, die unmittelbare Ursache der Erkrankung und die neurofibrillären Tangles, der Neuronenverlust und die Demenz sind direkte Folgen dieser Ablagerung (Abbildung 7). Das A β -Peptid entsteht aus der aufeinanderfolgenden endoproteolytischen Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP) durch die β -Sekretase und die γ -Sekretase (Haass und Selkoe, 1993). Dabei variiert die Länge des Peptids zwischen 37 und 43 Aminosäuren, mit A β 40 und A β 42 als den bekannteren Spezies (Abbildung 8).

Die Amyloid-Hypothese gründet unter anderem auf dem Befund, dass Mutationen im APP die Ablagerung des A β -Peptids fördern und zu einer früh einsetzenden, vererbaren Form der Alzheimerschen Krankheit führen (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991). Die Hypothese fordert, dass andere Ursachen der Erkrankung ebenfalls zu einer veränderten Produktion oder Beseitigung des A β -Peptids führen (Hardy und Higgins, 1992). Tatsächlich lässt sich die Mehrzahl der familiären Form der Alzheimer Krankheit auf Mutationen in den Genen Psen1 und Psen2 zurückführen, welche für die katalytische Unterheit der γ -Sekretase Präsenilin1 (PS1) beziehungsweise Präsenilin2 (PS2) kodieren (Levy-Lahad *et al.*, 1995; O'Brien und Wong, 2011; Sherrington *et al.*, 1995). Grundsätzlich führen diese Mutationen zu einer veränderten Prozessierung des APP-Substrats, welche das Verhältnis von A β 42/A β 40 zu Gunsten des stärker aggregierenden A β 42 verschiebt (Karran *et al.*, 2011) und ursächlich mit dem Ausbruch der Krankheit zusammenhängt (Hellstrom-Lindahl *et al.*, 2009). Auch das ApoE, der bedeutendste genetische Risikofaktor für die Alzheimer Krankheit, ist wesentlich für den Haushalt des A β -Peptid, da es für die Bindung und den Abtransport des schädlichen Peptids aus dem Gehirn verantwortlich ist (Kim *et al.*, 2009; Reiman *et al.*, 2009).

Weiterhin postuliert die Amyloid-Hypothese, dass das A β -Peptid *per se* toxisch ist (Hardy und Higgins, 1992). Allerdings korreliert das Ausmaß der Belastung durch amyloide Plaques schlecht mit dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten bei Alzheimer Patienten (Gomez-Isla *et al.*, 1997; Terry *et al.*, 1991). Dies deutet darauf hin, dass die Plaques möglicherweise nicht die primär-toxische Spezies sind. Das Niveau der löslichen A β -Peptid Formen zeigt sich dagegen bedeutend aussagekräftiger bezüglich des Vorhandenseins und des Grades der kognitiven Einschränkungen (Lue *et al.*, 1999; McLean *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Daher wird das eigentliche toxische Potential in den löslichen A β -Oligomeren vermutet. Tatsächlich inhibieren synthetische Präparationen und *in vitro* hergestellte Oligomere LTP und verschlechtern das Lernverhalten von Ratten (Cleary *et al.*, 2005; Kamenetz *et al.*, 2003; Townsend *et al.*, 2006). Posttranslationale Modifikationen des Peptids, wie Nitrierung oder Pyroglutaminierung, sind dabei möglicherweise essentiell für die A β -vermittelte Toxizität beziehungsweise verstärken diese (Kummer *et al.*, 2011; Nussbaum *et al.*, 2012). Als Konsequenz kommt es zu einem Untergang von Synapsen, der dem Nervenzellverlust vorausgeht (Davies *et al.*, 1987). So korreliert der Synapsenverlust am besten mit den Beeinträchtigungen der kognitiven Leistungen bei Patienten (DeKosky und Scheff, 1990; Terry *et al.*, 1991). Hinsichtlich der *per se* Toxizität überzeugt die Amyloid-Hypothese allerdings nicht und unterschätzt den Einfluss des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, das im pathologischen Zustand

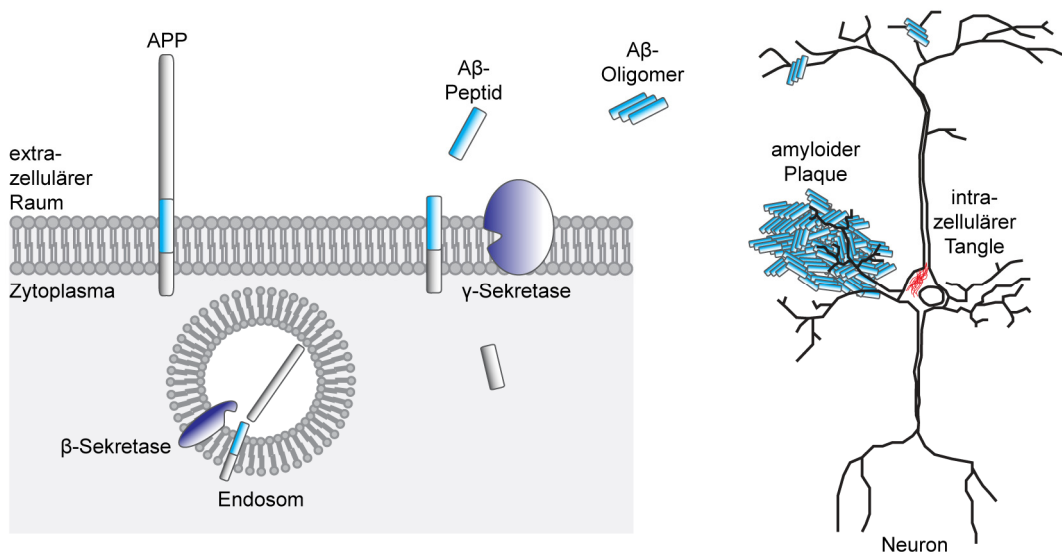


Abbildung 7. Genese des Aβ-Peptids und Aβ-Pathologie bei der Alzheimerschen Erkrankung.

Das Amyloid-Vorläuferprotein APP wird durch die β-Sekretase im Endosom und anschließend durch die γ-Sekretase endoproteolytisch geschnitten und so das Aβ-Peptid in den extrazellulären Raum sezerniert. Das Aβ-Peptid aggregiert zu löslichen Aβ-Oligomeren und den amyloiden Plaques. Obwohl es an den amyloiden Plaques zu dendritischen Aufschwellungen und einer massiven Gliose kommt, scheinen die Aβ-Oligomere ein größeres toxisches Potential zu haben. Innerhalb der neuronalen Zellkörper kommt es durch bisher ungeklärte Mechanismen zur Fehlverteilung und Aggregation des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, was für den eigentlichen Synapsen- und Nervenzelluntergang verantwortlich zu sein scheint.

hyperphosphoryliert und fehlverteilt ist und zu den fibrillären Tangles aggregiert. Mutationen im Tau-Gen führen zu einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen wie der Frontotemporalen Demenz (*frontotemporal lobar degeneration*, FTL) (Hutton *et al.*, 1998), jedoch nicht zur Alzheimerschen Erkrankung. Interessanterweise ähnelt die Pathologie bei FTL-Fällen der Tau-Pathologie der Alzheimer Erkrankung, jedoch ohne das Vorhandensein von Aβ-Ablagerungen. Daher wird davon ausgegangen, dass die Tau-Pathologie neurotoxisch ist und bei der Alzheimerschen Erkrankung eine Folge der Aβ-Ablagerungen darstellen könnte (Karran *et al.*, 2011). Dementsprechend wurde in Mausmodellen und in Zellkulturstudien gezeigt, dass der genetische *knockout* von Tau Aβ-induzierten Schädigungen wie Lerndefiziten, der LTP-Minderung und dem Nervenzelluntergang vorbeugt (Nussbaum *et al.*, 2012; Roberson *et al.*, 2011; Roberson *et al.*, 2007). Mechanistisch könnte dabei die Kinase Fyn eine wichtige Rolle spielen, da gezeigt wurde, dass Tau über Fyn auch die NMDA-Rezeptoren im dendritischen Spine reguliert. Dendritisch fehlverteiltes zusätzliches Tau könnte demnach zu einem excitotoxischen Untergang von Spines und Synapsen führen (Ittner *et al.*, 2010).

Trotz der beschriebenen Erfolge bei der Aufklärung der molekularen Grundlagen der Alzheimerschen Erkrankung gibt es zurzeit noch keine adäquate krankheitsmodifizierende

Behandlung. Auf der Basis der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde bei der Entwicklung potentieller Therapeutika der Schwerpunkt auf die Senkung der A β -Level gelegt. Verschiedene Ansätze wie die Bindung von cerebralem A β durch aktive oder passive Immunisierung, die Inhibition der Aggregation oder die Modulation der A β -generierenden Sekretasen waren dabei bisher weitestgehend ineffektiv und brachten die Amyloid-Hypothese in die Kritik. Ein besseres Verständnis der zellbiologischen Zusammenhänge der einzelnen Schlüsselproteine der Krankheit und eine noch detailliertere Charakterisierung der multifaktoriellen Alzheimer-Pathologie sind Voraussetzung für neue, erfolgversprechende therapeutische Ansätze.

3.2.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein APP

APP ist ein Typ-1 orientiertes Transmembranprotein mit einer relativ großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytosolischen Domäne, dessen korrespondierendes Gen auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist (Kang *et al.*, 1987). Es ist Mitglied der sogenannten APP-Proteinfamilie, für die in Säugetieren die beiden Homologen APLP1 und APLP2 (*amyloid precursor like protein1/2*) beschrieben sind (Wasco *et al.*, 1992; Wasco *et al.*, 1993). Während seiner Reifung durchläuft das Protein in der Zelle den sekretorischen Pfad und wird posttranslational durch Glycosylierungen, Phosphorylierungen und Sulfatierung modifiziert (Haass *et al.*, 2012). Bei der sequenziellen Proteolyse des APP durch die Sekretasen wurden zwei unterschiedliche Wege identifiziert. Das pathogene A β -Peptid wird während der amyloiden Prozessierung gebildet, bei der die APPs β -Ektodomäne in Endosomen durch die β -Sekretase befreit wird und das verbleibende C-terminale Fragment (CTF) C99 in einer Reihe aufeinanderfolgender Schritte durch die γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne geschnitten wird (Abbildung 8) (Haass und Selkoe, 1993). Die Prozessierung durch die γ -Sekretase findet an der Zelloberfläche oder in den Endosomen statt und setzt das A β -Peptid und die intrazelluläre Domäne (*APP intracellular domain*, AICD) frei (Haass *et al.*, 2012). Da die Position dieses proteolytischen Schnittes heterogen ist, entstehen A β -Peptide mit einer Länge zwischen 37 und 43 Aminosäuren (Abbildung 8). Im alternativen nicht-amyloiden Prozessierungsweg wird APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz geschnitten, was zur Sekretion des extrazellulären APPs α -Fragments führt (Esch *et al.*, 1990; Sisodia *et al.*, 1990). α -Sekretase-Aktivität wurde für Proteinasen der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloprotease*) gezeigt (Allinson *et al.*, 2003), von denen ADAM10 das verantwortliche neuronale Enzym zu sein scheint (Kuhn *et al.*, 2010). Der anschließende Schnitt des membranständigen α CTF (oder C83) durch die γ -Sekretase resultiert in der Freisetzung des kleinen Peptids p3, das für die Alzheimer-Pathologie keine Relevanz hat (Abbildung 8).

Eine Reihe physiologischer Funktionen wurde für das Gesamtlängen-APP und die verschiedenen proteolytischen Fragmente vorgeschlagen. Als Zelladhäsionsprotein könnte die transzelluläre APP/APP-Interaktion für die Stabilisierung von Synapsen verantwortlich sein (Wang *et al.*, 2009b). Weiterhin wurde eine Vielzahl extrazellulärer Liganden beschrieben, die eine Funktion von APP als Zelloberflächenrezeptor nahelegen (Zheng und Koo, 2011). Unterstützt wird diese Annahme durch

die Ähnlichkeit der APP-Prozessierung zum Notch-Signalweg. Ligandenbindung an den Notch-Rezeptor resultiert in der Intramembran-Proteolyse durch die γ -Sekretase und der Freisetzung des NICD (*Notch intracellular domain*), welches direkt die Transkription von Zielgenen aktiviert (Selkoe und Kopan, 2003). Für die sezernierte APP-Ektodomäne wurden synaptotrophe Effekte beobachtet, wie eine erhöhte synaptische Dichte, ein gefördertes Auswachsen der Neuriten und ein verbessertes Lernen (Gakhar-Koppole *et al.*, 2008; Meziane *et al.*, 1998). Schließlich spielt das A β -Peptid selbst eine wichtige Rolle bei der synaptischen Physiologie. Als *feedback* Inhibitor wird A β nach erhöhter neuronaler Aktivität sezerniert, um die exzitatorische postsynaptische Antwort zu dämpfen und einer Hyperaktivität entgegenzuwirken (Kamenetz *et al.*, 2003). Auf der präsynaptischen Seite kann

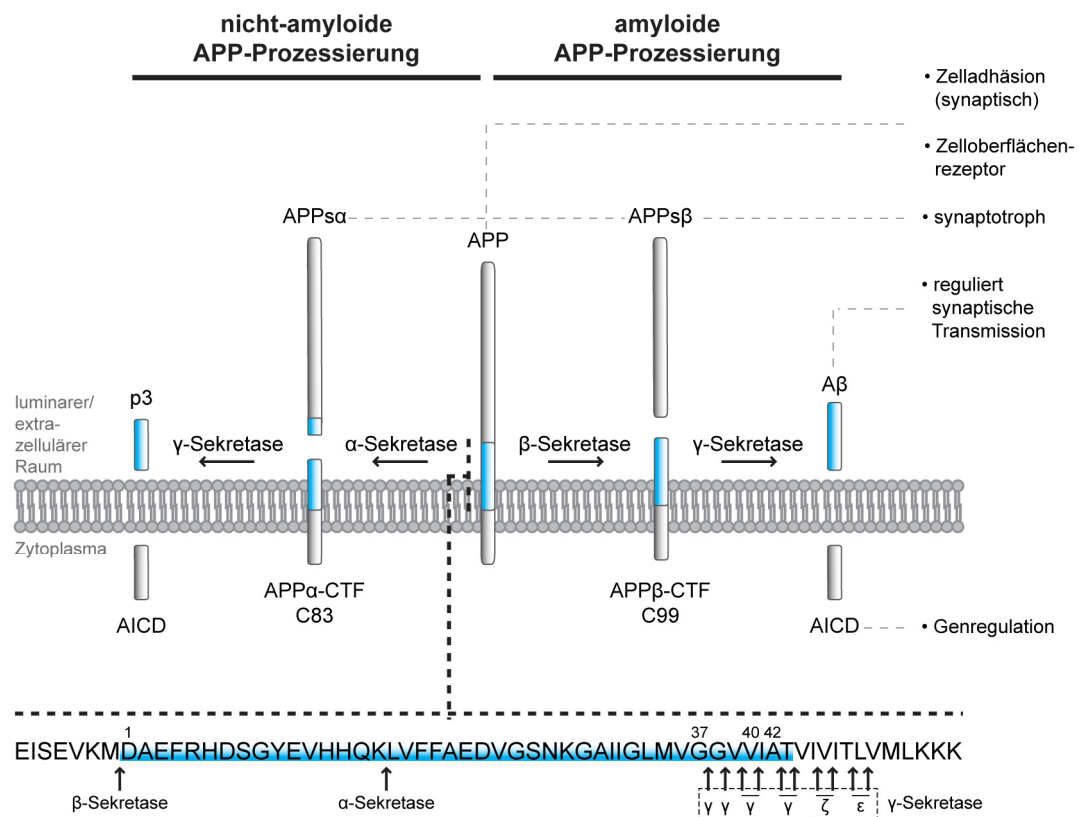


Abbildung 8. Prozessierung von APP und postulierte Funktionen der unterschiedlichen Spaltprodukte. Bei der nicht-amyloiden Prozessierung wird APP innerhalb der A β -Sequenz von der α -Sekretase geschnitten, bevor das verbleibende membranständige APP α -C-terminale Fragment (CTF) durch die γ -Sekretase prozessiert wird. Alternativ wird bei der amyloiden Prozessierung durch die β -Sekretase die APPs β -Ektodomäne (s für *soluble*) abgespalten. Der anschließende γ -Sekretase-Schnitt befreit die zytosolische APP intrazelluläre Domäne (AICD) und das für die Alzheimer'sche Erkrankung zentrale A β -Peptid. Im unteren Teil der Abbildung ist der relevante Sequenzabschnitt des APP dargestellt und die A β -Sequenz in blau hervorgehoben. Markiert sind die spezifischen Schnittstellen der α - und der β -Sekretase und der flexible Schnittbereich der γ -Sekretase, die in einem Abstand von typischerweise drei Aminosäuren erst an einer ϵ - und einer ζ -Position schneidet und schließlich durch die hervorgehobenen γ -Schnittstellen die unterschiedlichen A β -Fragmente mit einer Länge von 37 bis 43 Aminosäuren generiert.

das Peptid die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel modulieren (Abramov *et al.*, 2009). Die Bedeutung von APP für die Ausbildung und die Regulation von Synapsen wird auch von Studien in APP-*knockout* Mäusen unterstützt. Der Verlust von APP führt zu einer veränderten Dichte kortikaler dendritischer Spines (Bittner *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010a). Der zusätzliche *knockout* von APLP2 resultiert in einer gestörten Ausbildung der neuromuskulären Synapse (Wang *et al.*, 2005). Die subzelluläre Lokalisation des APP konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden und es wird davon ausgegangen, dass das Protein sowohl in die Axone als auch in die Dendriten transportiert wird (Haass *et al.*, 2012). Während APP ursprünglich als eher axonales Protein beschrieben wurde, belegen neuere Studien, dass auch Dendriten A β sezernieren (Wei *et al.*, 2010) beziehungsweise die Prozessierung von APP ausschließlich im somatodendritischen Kompartiment stattfindet (Sannerud *et al.*, 2011).

3.2.4 Die β -Sekretase BACE1

Als β -Sekretase wurde BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme1*; Memapsin-2; ASP-2) zur gleichen Zeit von fünf Gruppen unabhängig identifiziert (Hussain *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). BACE1 ist, wie das homologe BACE2, eine membranständige Aspartat-Endopeptidase mit einer Transmembrandomäne und einem luminal/extrazellulär-orientiertem aktiven Zentrum (Hussain *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999). Nach posttranslationaler Modifikation wird das BACE1-Proenzym im Golgi Apparat durch Furin konvertiert (Dislich und Lichtenthaler, 2012). Das mature Protein wird schließlich von der Plasmamembran in das endosomale Kompartiment transportiert, deren saure Umgebung das pH-Optimum für die enzymatische Aktivität der Protease darstellt (Huse *et al.*, 2000; Vassar *et al.*, 1999). BACE1 wurde vorrangig neuronal gefunden, mit einer besonders hohen Expression in der frühen postnatalen Phase (Vassar *et al.*, 1999; Willem *et al.*, 2006). Ähnlich kontrovers wie APP, wurde BACE1 in Nervenzellen einerseits in den Axonen, andererseits in den Dendriten lokalisiert (Sannerud *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2003).

Dass BACE1 die wesentliche, wenn nicht einzige APP-prozessierende β -Sekretase ist, konnte in Mäusen gezeigt werden. Die Verkreuzung transgener Mausmodelle der Alzheimerschen Erkrankung, die normalerweise ausgeprägte A β -Ablagerungen zeigen, auf einen BACE1-*knockout* Hintergrund verhinderte jedwede A β -assoziierte Pathologie (Laird *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2004). Damit stellt BACE1 ein interessantes Zielprotein für therapeutische Interventionen der Generierung des A β -Peptids dar und zahlreiche Ansätze zur pharmakologischen Inhibition der Protease wurden beschrieben. Allerdings ist die katalytische Bindestelle von BACE1 untypisch groß, so dass die Inhibition der Aktivität mit kleinen Molekülen, die die Blut-Hirn-Schranke gut passieren, erschwert ist (Vassar und Kandalepas, 2011)

Wie unbedenklich der Einsatz BACE1-modifizierender therapeutischer Ansätze ist, hängt natürlich auch von den physiologischen Funktionen des Enzyms ab. Eine Reihe von BACE1-Substraten wurde

bereits vorgeschlagen (Hemming *et al.*, 2009), von denen allerdings erst wenige verifiziert werden konnten. Neben APP und APLP1/2 sind weitere Beispiele Neuregulin1 (NRG1) (Willem *et al.*, 2006), die Untereinheiten des spannungsabhängigen Natrium-Kanals $\text{Na}_v1.1\beta1-4$ (Kovacs *et al.*, 2010) oder LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein*) (von Arnim *et al.*, 2005). Der Verlust der BACE1-Aktivität in *knockout*-Mäusen hatte keine offensichtlichen Konsequenzen, die Tiere waren lebens- und fortpflanzungsfähig (Cai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001). Spätere detaillierte Beschreibungen konnten jedoch auf einige phenotypische Anomalien aufmerksam machen. So war die Myelinisierung peripherer Nerven gestört, was auf einen Verlust der NRG1-Prozessierung zurückgeführt werden konnte (Willem *et al.*, 2006). Weiterhin zeigten die BACE1-*knockout* Tiere Schizophrenie-assoziierte Verhaltensauffälligkeiten (Savonenko *et al.*, 2008) und waren empfindlicher für epileptische Anfälle (Hitt *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010). Ein möglichst weitreichendes Wissen über die Substrate von BACE1 und deren Funktionen ist wichtig, um potentielle therapeutische Inhibitoren sehr genau auf neurophysiologische Nebenwirkungen zu kontrollieren. Im Moment sind BACE1-Inhibitoren von Eli Lilly, Merck und AstraZeneca in der klinischen Testung.

3.2.5 Präsenilin und die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (De Strooper, 2003) und zeichnet sich durch die besondere Eigenschaft aus, dass sie Peptidbindungen von Transmembranproteinen in der hydrophoben Umgebung einer Lipidmembran spalten kann (Busciglio *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992). Das katalytische Zentrum bilden die Präseniline PS1 oder PS2, die jeweils neun Transmembrandomänen besitzen (Laudon *et al.*, 2005) und während der Maturierung in ein aminoterminales und ein carboxyterminales Fragment gespalten werden (Thinakaran *et al.*, 1996). Zwei Aspartatreste in den Transmembrandomänen VI und VII sind essentiell für die katalytische Aktivität der Präseniline (Wolfe *et al.*, 1999). Komplettiert wird die γ -Sekretase durch Nicastrin, Aph-1 (*anterior pharynx-defective phenotype*) und Pen-2 (*presenilin enhancer*), die im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1:1 zu den Präsenilinen stehen (Abbildung 9) (De Strooper, 2003). In der Zelle wurde der vollständige γ -Sekretase-Komplex in der Plasmamembran und in Endosomen gefunden, während das ungeschnittene Präsenilin-Holoprotein und Zwischenstufen des Komplexes in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und im frühen sekretorischen Transportweg lokalisiert sind (Haass *et al.*, 2012).

Mutationen in Psen1 und Psen2, den korrespondierenden PS1 beziehungsweise PS2 Genen, haben zur Identifikation der Proteine und ihrer zentralen Rolle bei der Alzheimerschen Erkrankung geführt (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Es wurden bisher 179 Psen1-, 14 Psen2- und 32 APP-Mutationen entdeckt, die für eine vererbte und früh einsetzende Form der Alzheimer Krankheit verantwortlich sind (FAD-Mutationen) (O'Brien und Wong, 2011). Mit der transgenen Expression von FAD-mutiertem APP oder einer Kombination aus APP und PS1 konnten die A β -Pathologie im Mausgehirn nachgestellt und Aspekte dieser Pathologie, wie das Wachstum der

amyloiden Plaques (Burgold *et al.*, 2011) und der Verlust von Synapsen (Koffie *et al.*, 2009) und Neuronen (Fuhrmann *et al.*, 2010), im Detail studiert werden. Allerdings zeigen Mäuse, die ausschließlich FAD-PS1 exprimieren, keine Amyloid-Pathologie, da sich vermutlich das Aggregationsverhalten von murinem A β von dem des humanen Peptids unterscheidet (Jankowsky *et al.*, 2007). Entgegen den Erwartungen für ein Alzheimer-Modell, konnten bei elektrophysiologischen Untersuchungen von FAD-PS1 transgenen Mäusen verbesserte synaptische Eigenschaften beobachtet werden (Auffret *et al.*, 2009; Dewachter *et al.*, 2008; Parent *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2001; Zaman *et al.*, 2000). Demgegenüber führt der konditionale Verlust von PS1 zu keinen Veränderungen bei der basalen synaptischen Transmission oder beim LTP (Feng *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). PS1-Mutationen könnten daher über die A β -Pathologie hinaus Einfluss auf synaptische Funktionen haben.

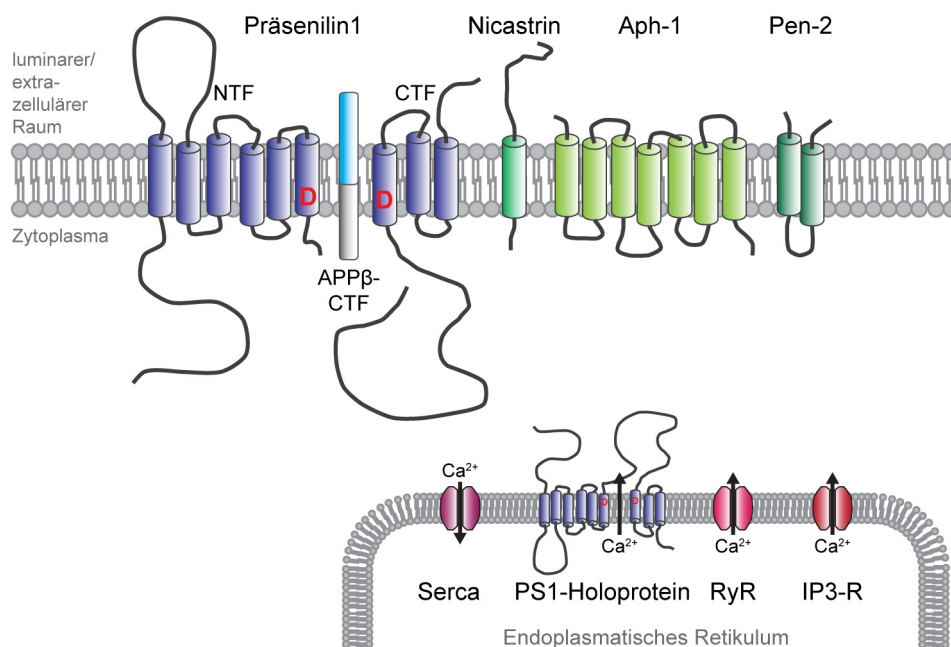


Abbildung 9. Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes und die Präsenilin1 (PS1) abhängige Regulation der Ca^{2+} -Homöostase. Im vollständigen γ -Sekretase-Komplex liegt PS1 (oder PS2) als Heterodimer (C- und N-terminales Fragment, CTF und NTF) vor, welches wahrscheinlich durch Autoproteolyse entsteht. Die beiden Aspartatreste D257 und D385 (rot hervorgehoben) bilden das katalytische Zentrum und sind in den beiden Transmembrandomänen VI und VII lokalisiert. Komplettiert wird der Komplex durch Nicastrin, das möglicherweise für die Auswahl der Substrate mitverantwortlich ist (Shah *et al.*, 2005), Pen-2, welches die Autoproteolyse von PS1 unterstützt (Prokop *et al.*, 2004) und Aph-1 (*anterior pharynx defective*) für die Komplexbindung (LaVoie *et al.*, 2003). Die Präsenilinen spielen außerdem bei der Regulation des zellulären Ca^{2+} -Haushaltes eine Rolle. Mechanistisch wurde diesbezüglich vorgeschlagen, dass das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisierte PS1-Holoprotein selbst als Ca^{2+} -Kanal fungiert (Tu *et al.*, 2006), die Ca^{2+} -Einfuhr über die Sarco-/Endoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) stimuliert (Green *et al.*, 2008) oder die Expression des Ryanodin-Rezeptors (RyR) (Smith *et al.*, 2005) beziehungsweise die Sensitivität des Inositol-3-Phosphat Rezeptors (IP3-R) beeinflusst (Cheung *et al.*, 2008).

Über 60 Substrate wurden für die γ -Sekretase beschrieben, mit APP und Notch als den beiden bekanntesten (Wakabayashi und De Strooper, 2008). Die proteolytische Spaltung findet innerhalb von Transmembrandomänen und ohne eine bestimmte Sequenzspezifität statt. Sie bedarf allerdings einer kurzen extrazellulären Domäne, die beim APP durch den vorausgegangenen α/β -Schnitt realisiert wird (Lichtenthaler *et al.*, 1999; Struhl und Adachi, 2000). Außerhalb des γ -Sekretase-Komplexes scheinen die Präseniline wichtig für den intrazellulären Transport bestimmter Proteine zu sein. So gelangt die Protonenpumpe v-ATPase V0a1, die für das saure Milieu der Lysosomen verantwortlich ist, in PS1-defizienten Zellen nicht an ihren Bestimmungsort, was zu einem gestörten lysosomalen Proteinabbau führt (Lee *et al.*, 2010c). Neue Befunde stellen diese Funktion allerdings in Frage (Zhang *et al.*, 2012). In einer Reihe von Studien wurde übereinstimmend die Rolle der Präseniline bei der Ca^{2+} -Homöostase bestätigt (Bezprozvanny und Mattson, 2008). Auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus kontrovers diskutiert wird, scheinen die Präseniline an der Regulation der Ca^{2+} -Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum beteiligt zu sein (Abbildung 9). FAD-Mutationen, einschließlich der Mutation A246E, für die dieser Effekt anfänglich beschrieben wurde, stören das zelluläre Ca^{2+} -Gleichgewicht und können so entscheidend zur Alzheimer Pathologie beitragen (Bezprozvanny und Mattson, 2008; Ito *et al.*, 1994; LaFerla, 2002).

4 Ergebnisse

4.1 Das *Enriched Environment* induziert strukturelle Plastizität

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit strukturelle Plastizität im somatosensorischen Kortex von Mäusen durch ein *Enriched Environment* modifiziert werden kann. Verschiedene Studien haben bereits den Einfluss sensorischer Stimulation auf synaptische Spines kortikaler Neurone mittels *in vivo* Mikroskopie analysiert (Fu und Zuo, 2011). Dabei wurden ursprünglich Stimulationsprotokolle verwendet, die die sensorischen Reize in unphysiologischer Weise unterdrückten, wie das Stutzen der Vibrissen oder das Verschließen der Augen (Fu und Zuo, 2011). In neueren Arbeiten konnten allerdings auch Veränderungen dendritischer Spines charakterisiert werden, die auf spezifische Lernerfahrungen zurückzuführen sind (Fu und Zuo, 2011). Der Einfluss einer breiten physiologischen Stimulation der Sensorik, wie sie durch das *Enriched Environment* erzielt wird, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Für die folgenden Experimente wurde daher ein möglichst komplexer *Enriched*-Käfig eingerichtet, mit Objekten und Spielzeug aus verschiedenen Materialien und mit unterschiedlicher Textur (Abbildung 10A). Um wiederkehrend neue Stimulation zu erreichen, wurde der Käfig alle zwei bis drei Tage neu gestaltet. Für die *Enriched Environment* Versuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse der Linie YFP-H verwendet.

4.1.1 Der Effekt eines „*Enriched Environments* seit der Geburt“ auf dendritische Spines sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen

Um den maximalen Effekt eines *Enriched Environments* auf dendritische Spines zu ermitteln, wurden in einem ersten Ansatz Mäuse untersucht, die seit ihrer Geburt im *Enriched*-Käfig gehalten wurden. Dazu wurden schwangere Mäuse der Linie YFP-H ins *Enriched Environment* gesetzt. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Mütter und die männlichen Geschwister aus dem Käfig entfernt und die weiblichen Nachkommen hinsichtlich des YFP-Transgens genotypisiert. Im Alter von drei Monaten wurde den YFP-positiven Mäusen ein kraniales Fenster über dem somatosensorischen Kortex implantiert (Abbildung 10B). Mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden dendritische Elemente von fluoreszenzmarkierten kortikalen Neuronen beginnend mit

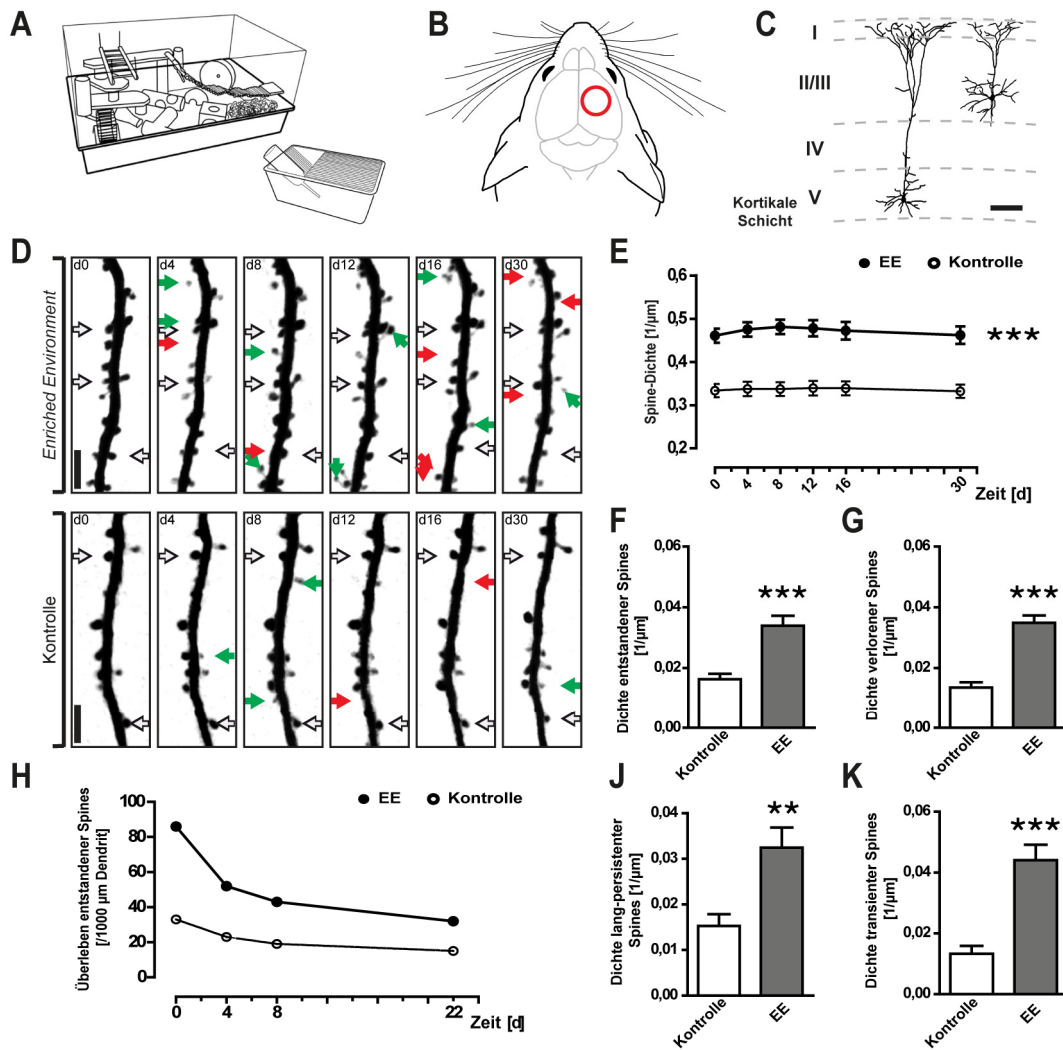


Abbildung 10. Ein „Enriched Environment“ seit der Geburt induziert strukturelle Plastizität an sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen. (A) Schematische Zeichnung des *Enriched*-Käfigs neben einem Standardkäfig. (B) Rot angedeutet ist die Lage des kranialen Fensters über dem somatosensorischen Kortex einer Maus. (C) Seitliche Ansicht kortikaler fluoreszenzmarkierter Neurone einer YFP-H Maus. Sich verzweigende apikale Dendriten von Schicht V Neuronen (linkes Neuron) wurden typischerweise in einer Tiefe von 20-70µm mikroskopiert. Die basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen (rechtes Neuron), die im Folgenden ebenfalls beschrieben werden, wurden in einer Tiefe von 150-250µm aufgenommen. (Maßstabsleiste 100µm) (D) Repräsentative Zeitserie exemplarischer Dendriten, die über einen Zeitraum von 30 Tagen *in vivo* beobachtet wurden. Die schwarz-weißen Pfeile markieren ausgewählte dendritische Spines, die über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil waren. Demgegenüber heben die grünen Pfeile alle neu entstandenen Spines hervor und die roten Pfeile markieren die Stellen, an denen Spines verloren gegangen waren. (Maßstabsleisten 5µm) (E) Die Dichte dendritischer Spines an apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen ist erhöht bei Mäusen, die seit ihrer Geburt im *Enriched Environment* gehalten wurden. Über den Beobachtungszeitraum ist die Spine-Dichte stabil. (In der *Enriched* Gruppe wurden 41 Dendriten von insgesamt sechs Mäusen ausgewertet, in der Kontrollgruppe waren es 37 Dendriten in fünf Mäusen). (F-G) Die Dichte der entstandenen (F) und der verlorenen (G) Spines. (H) Überleben entstandener Spines. (I-K) Die Dichte der langpersistenter (I) und der transients (K) Spines. →

einem Alter von vier Monaten analysiert. Als Kontrollgruppe dienten weibliche YFP-H Mäuse, die nach dem Absetzen allein in Standardkäfigen gehalten, ansonsten aber identisch behandelt wurden. Der zeitliche Ablauf des Experiments ist in Abbildung 30 schematisch zusammengefasst.

Als erste Population an Dendriten wurden die fluoreszenzmarkierten apikalen Dendriten der Schicht V Neurone des somatosensorischen Kortex untersucht. Die Verzweigungen dieser Dendriten lassen sich relativ einfach in einer Tiefe von 20-70µm mikroskopieren (Abbildung 10C) und werden daher standardmäßig in *in vivo* mikroskopischen Experimenten analysiert. Um apikale Dendriten von Schicht V Neuronen eindeutig zuzuordnen und von vereinzelt apikalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen zu unterscheiden, wurden Übersichtsaufnahmen bis zu einer Tiefe von 350µm gemacht. Da die Zellkörper der Schicht II/III Neurone typischerweise in einer Tiefe von 150-300µm liegen, wurden apikale Dendriten, die darüber hinaus keinem Zellkörper zugewiesen werden konnten, als Schicht V klassifiziert (Abbildung 29). Die Abbildung 10D zeigt, wie sich die mikroskopierten Dendriten mit den Spines über die Zeit in einem solchen Experiment darstellten. In Mäusen, die seit ihrer Geburt im *Enriched Environment* gehalten wurden, war die Dichte der dendritischen Spines, also die Anzahl der Spines dividiert durch die Länge des entsprechenden Dendriten, im somatosensorischen Kortex signifikant erhöht (Abbildung 10E). Während die Kontrolldendriten eine Dichte von $0,33 \pm 0,02/\mu\text{m}$ aufwiesen, entsprechend der Größenordnung bereits publizierter Studien (Holtmaat *et al.*, 2005), lag die Spine-Dichte der Tiere des *Enrichment* bei $0,46 \pm 0,02/\mu\text{m}$. Über einen Zeitraum von 30 Tagen blieb die Spine-Dichte unverändert (Abbildung 10E). Die Dichte der Spines, die innerhalb von vier Tagen neu entstanden waren (Abbildung 10F), als auch die Dichte der verloren gegangenen Spines (Abbildung 10G) waren wesentlich erhöht in der Gruppe der *Enriched Environment* Mäuse. Dabei entsprachen sich die Verhältnisse der entstandenen und der verlorenen Spines zwischen den Gruppen, was sich auch in der gleichbleibenden Netto-Spine-Dichte über den Beobachtungszeitraum widerspiegelte (Abbildung 10E)

Da dendritische Spines als strukturelles Korrelat von Erinnerungen diskutiert werden, war es interessant, sich das Schicksal einzelner neu gebildeter Spines im Detail anzuschauen. Innerhalb der ersten drei Beobachtungszeitpunkte wurden bei den *Enriched*-Mäusen 143 neu entstandene Spines

gegangenen Spines (**G**) ist bei den Mäusen des *Environmental Enrichments* um ein ähnliches Level erhöht. (**H-K**) Das Schicksal von dendritischen Spines, die innerhalb der ersten drei Beobachtungszeitpunkte neu entstanden sind, wurde detailliert analysiert. (**H**) Insgesamt 143 entstandene Spines (an 1667µm Gesamtdendrit) in der *Enriched Environment* Gruppe und 62 neu gebildete Spines (an 1907µm Gesamtdendrit) der Kontrollgruppe wurden zu den sich anschließenden Zeitpunkten verfolgt. (**J**) In der *Enriched Environment* Gruppe sind mehr entstandene Spines über einen Zeitraum von 22 Tagen stabil. (**K**) In der *Enriched Environment* Gruppe geht ein höherer Anteil an neu gebildeten Spines innerhalb von acht Tagen wieder verloren, welche somit als transiente Spines klassifiziert werden. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; $*** P > 0,001$, $** P > 0,01$)

detektiert (an 1667µm Gesamtdendrit), während die Kontrollen 62 neue Spines aufwiesen (an 1907µm Gesamtdendrit). Diese Spines wurden über die sich anschließenden Beobachtungszeitpunkte verfolgt (Abbildung 10H). In der Gruppe des *Environmental Enrichments* blieb eine signifikant höhere Anzahl neuer Spines für wenigsten 22 Tage bestehen (Abbildung 10J). Nach der Studie von Knott *et al.*, 2006 kann davon ausgegangen werden, dass diese Spines funktional in das neuronale Netzwerk integriert wurden. Gleichzeitig war bei den *Enriched Environment* Mäusen aber auch die Dichte der transienten Spines, die eine Überlebenszeit von weniger als 8 Tagen haben, signifikant erhöht (Abbildung 10K).

4.1.2 Der Effekt des „*Enriched Environments* seit der Geburt“ auf dendritische Spines basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen

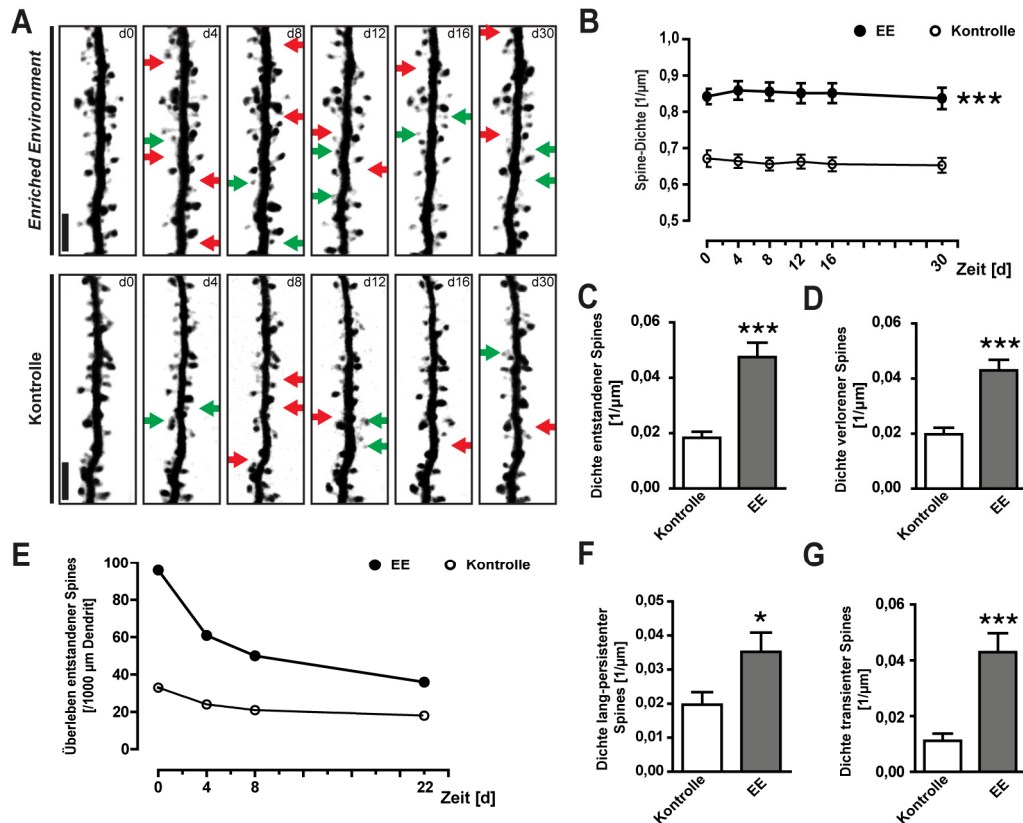
In bisherigen intravital-mikroskopischen Studien wurden ausschließlich sich verzweigende apikale Dendriten kortikaler Neurone untersucht (Fu und Zuo, 2011). Nach dem Stand der Literatur wurden daher in der vorliegenden Arbeit erstmalig auch die basalen Dendriten von Neuronen der kortikalen Schicht II/III *in vivo* aufgenommen. Diese befinden sich typischerweise in einer Tiefe von 150-250µm (Abbildung 10C) und sind daher schwerer zu mikroskopieren. Die Dichte dendritischer Spines an den basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen (Abbildungen 11A und 11B) war unter Kontrollbedingungen mit $0,67 \pm 0,02/\mu\text{m}$ höher, verglichen mit den sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen. Der Aufenthalt im *Environmental Enrichment* führte zu einer darüber hinaus gesteigerten Spine-Dichte an diesen Dendriten (Abbildungen 11A und 11B). In beiden Fällen blieb die Spine-Dichte über den Beobachtungszeitraum stabil (Abbildung 11B). Hinsichtlich der Spine-Dynamiken waren sowohl das Entstehen neuer Spines (Abbildung 11C) als auch der Verlust von Spines (Abbildung 11C) in der *Enriched*-Gruppe erhöht. Auch hier wurde das Schicksal neu gebildeter Spines verfolgt (Abbildung 11D). Vergleichbar mit den Ergebnissen für die apikalen Dendriten der Schicht V Neurone, war die Dichte der Spines, die innerhalb der ersten acht Tage des Beobachtungszeitraumes gebildet wurden und über wenigstens drei Wochen stabil waren, heraufgesetzt (Abbildung 11F). Gleichzeitig war die Dichte der transienten Spines erhöht (Abbildung 11G).

4.1.3 Der Effekt eines akuten *Enriched Environments* auf dendritische Spines sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen

Im zweiten Teil der *Enriched*-Studie sollte ermittelt werden, wie ein unter Kontrollbedingungen etabliertes neuronales Netzwerk auf eine breite sensorische Stimulation reagiert. Dazu wurde als Bezugswert der Spine-Status kortikaler Dendriten von weiblichen YFP-H Mäusen im Alter von fünf bis sechs Monaten, die in Standardkäfigen gehalten wurden, mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie

aufgenommen. Im Anschluss wurden die Tiere in den *Enriched*-Käfig umgesetzt und die Veränderungen an genau diesen Dendriten über einen Zeitraum von 35 Tagen verfolgt (Abbildungen 12A und 30). Zusätzlich wurden als Kontrollen auch Mäuse mitgeführt, die durchgängig unter Standardbedingungen gehalten wurden.

An sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen stieg die Dichte dendritischer



Spines innerhalb von Tagen nachdem die Mäuse ins *Enriched Environment* gesetzt wurden (Abbildung 12B). Ein signifikanter Unterschied wurde nach 16 Tagen im *Environmental Enrichment* erreicht, als die Spine-Dichte verglichen mit den Kontrollen um etwa 20% erhöht war. Dem Graph

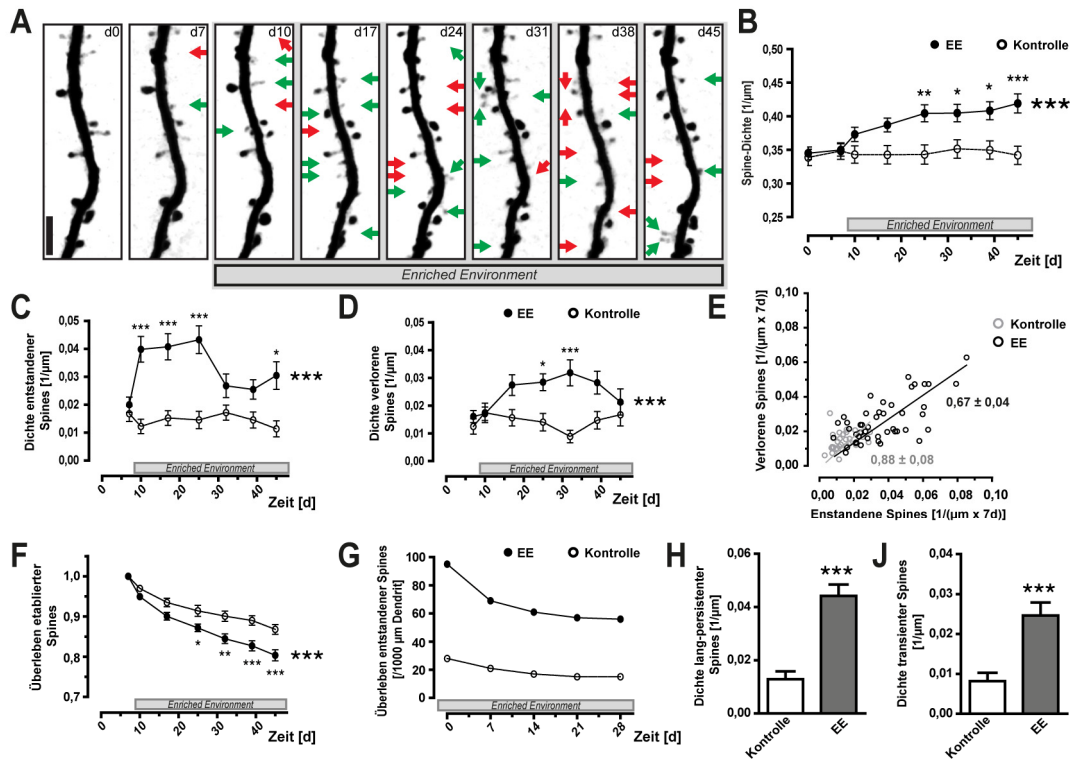


Abbildung 12. Ein akutes *Enriched Environment* induziert strukturelle Plastizität an sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen. (A) Repräsentativer Dendritenabschnitt einer Maus, die zu den ersten beiden Zeitpunkten noch unter Kontrollbedingungen gehalten wurde (d0 und d7), bevor sie in den *Enriched*-Käfig gesetzt wurde (grau unterlegt). Die grünen Pfeile markieren alle neu entstandenen Spines und die roten Pfeile die verloren gegangenen Spines. (Maßstabsleiste 5µm) (B) Die Spine-Dichte erhöht sich direkt nach Beginn des *Enriched Environments*. Es wurden bei der *Enrichment* Gruppe 45 apikale Dendritenabschnitte von Schicht V Neuronen von insgesamt acht Mäusen und bei den Kontrollen 31 Dendritenabschnitte von vier Mäusen ausgewertet. (C) Durch das *Enriched Environment* steigt die Dichte entstandener Spines unmittelbar an und vermindert sich später ohne auf das Kontrollniveau zu sinken. (D) Die Dichte der verlorenen Spines nimmt weniger rapide und weniger stark zu. (E) Aufgetragen wurden die durchschnittlichen Dichten der entstandenen Spines innerhalb der ersten vier Wochen des *Enriched Environment* gegen die durchschnittlichen Dichten der verloren gegangenen Spines für jeden einzelnen Dendriten. Die jeweiligen Regressionsgraden mit den entsprechenden Anstiegen sind ebenfalls angegeben. (F) Etablierte Spines, die zu den ersten beiden Zeitpunkten stabil sind, gehen zu einem größeren Anteil durch die Wirkung des *Enriched Environments* verloren. (G) Das Überleben von 228 entstandenen Spines (an 2391µm Gesamtdendrit), welche an den ersten zwei Beobachtungszeitpunkten im *Enriched Environment* gebildet wurden, wurde über die sich anschließenden vier Beobachtungszeitpunkte verfolgt und mit den 42 entstandenen Spines (an 1500µm Gesamtdendrit) der Kontrolltiere verglichen. (H) Von den neu entstandenen Spines sind in der *Enriched* Gruppe mehr Spines über 28 Tage stabil. (J) Gleichzeitig wird durch das *Enrichment* die Bildung transients Spines erhöht. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; *** $P > 0,001$, ** $P > 0,01$, * $P > 0,05$)

in Abbildung 12B zufolge hat es den Anschein, als laufe die Spine-Dichte nach Induktion durch das *Enrichment* auf einen Maximalwert zu, der bei etwas über $0,4/\mu\text{m}$ liegt. Ein drastischer Unterschied konnte für die neu entstandenen Spines festgestellt werden (Abbildung 12C). Nach einem Tag im *Enriched Environment* verdoppelte sich die Dichte der gebildeten Spines und blieb für zwei Wochen auf diesem Level. Danach ging die Dichte der entstandenen Spines zurück, jedoch ohne auf das Level der Kontrollmäuse zu fallen. Interessanterweise folgte die Dichte der verloren gegangenen Spines einer etwas anderen Kinetik (Abbildung 12D). Der Anstieg der verlorenen Spines setzte später ein und erreichte auch nicht das Ausmaß der entstandenen Spines. Deutlich wird dies auch in Abbildung 12E, bei der für jeden einzelnen Dendriten die Dichte der entstandenen gegen die Dichte der verlorenen Spines aufgetragen wurden, da die resultierende Regressionsgrade für die *Enriched Environment* Gruppe zur Seite der neu gebildeten Spines geneigt ist. Demgegenüber liegen Bildung und Verlust dendritischer Spines bei den Kontrollen im Gleichgewicht. Zusätzlich geht aus dieser Darstellung hervor, dass die Veränderungen relativ gleichmäßig verteilt sind und sich keine Verteilungscluster abzeichnen (Abbildung 12E). Dies deutet darauf hin, dass alle Dendriten in ähnlicher und genereller Weise durch die sensorische Stimulation des *Enriched Environments* betroffen waren.

Als nächstes wurde analysiert, wie etablierte Spines auf die neue Stimulation reagierten. Als etabliert wurden Spines definiert, die zu den beiden Beobachtungszeitpunkten vor dem *Enriched Environment* stabil waren und damit als persistent galten. Das Überleben dieser Spines wurde über die Zeit des *Enrichments* beobachtet und ist in Abbildung 12F dargestellt. Während bei den Kontrolltieren $86,8 \pm 1,2\%$ der etablierten Spines eine vergleichbare Zeitspanne überlebten, waren es in der *Enriched Environment* Gruppe mit $80,4 \pm 1,4\%$ signifikant weniger. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das *Enriched Environment* eine wesentliche Reorganisation des neuronalen Netzwerks bewirkte.

Weiterhin wurde das Schicksal der Spines detailliert verfolgt, welche im Zuge des *Enriched Environments* (genauer; an den ersten beiden Zeitpunkten des *Environmental Enrichments*) neu entstanden waren (Abbildung 12G). Gegenüber der Kontrolle überlebte eine größere Anzahl an entstandenen Spines einen Zeitraum von vier Wochen (Abbildung 12H). Interessanterweise zeigte ein Vergleich der beiden Versuchsgruppen, dass ein höherer Anteil der neu gebildeten Spines nach akutem *Enriched Environment* über einen entsprechenden Zeitraum stabil integriert werden konnte, als es für das Experiment mit dem „*Enrichment* seit der Geburt“ der Fall war (Abbildungen 10J und 12H). Die Dichte der transienten Spines war in der *Enriched Environment* Gruppe ebenfalls erhöht (Abbildung 12J).

4.1.4 Der Effekt eines akuten *Enriched Environments* auf dendritische Spines basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen

Auch für die basalen Dendriten der Schicht II/III Neurone wurde der Einfluss des akuten *Enriched Environments* untersucht. Es zeigte sich, dass beide Dendritenpopulationen in ähnlicher Weise auf die generelle sensorische Stimulation reagierten. Die Spine-Dichte der basalen Dendriten der Schicht II/III Neurone wurde um etwa 20% erhöht, was auf einen schnellen Anstieg der neu gebildeten Spines und einen verzögerten und weniger starken Anstieg der Dichte der verlorenen Spines zurückzuführen war (Abbildungen 13A-D). Die beobachteten Veränderungen für den Zuwachs und den Verlust dendritischer Spines waren gleichmäßig über die aufgenommenen Dendriten verteilt (Abbildung 13E). Von den etablierten Spines ging ein größerer Anteil verloren, wenn die Versuchstiere akut durch das *Enrichment* stimuliert wurden (Abbildung 13F). Von den Spines, die direkt mit dem Beginn des *Enriched Environments* neu gebildet wurden, wurden mehr langfristig stabilisiert als bei den Kontrolltieren (Abbildung 13G). Gleichzeitig wurden nach Stimulation durch das *Enrichment* mehr transiente Spines gebildet (Abbildung 13H).

4.1.5 Lentivirus-basierte Markierung kortikaler Neurone ermöglicht das *in vivo* Mikroskopieren von Axonen

Neben der Verwendung von transgenen Tiermodellen gewinnt der virale Gentransfer einen immer größeren Stellenwert bei dem Versuch, lebende Modellorganismen genetisch zu manipulieren. Dabei kann es vor allem in der Neurobiologie wichtig sein, spezifische Zellpopulationen bis hin zu Einzelzellen genetisch zu verändern, um die Funktion einzelner Gene oder den Einfluss einzelner Zellen im neuronalen Netz zu studieren. Replikationsdefiziente lentivirale Vektorsysteme eignen sich diesbezüglich, da sie in das Genom der Zielzelle integrieren und damit eine stabile Expression der entsprechenden Genprodukte gewährleisten. Außerdem bieten sie mit 8kb eine hohe Packungskapazität für transgene Sequenzen (Jakobsson und Lundberg, 2006).

Grundsätzlich sollte im Rahmen der Arbeit die genetische Modulation kortikaler Neurone mittels lentiviralen Vektoren etabliert werden, um diese mit der *in vivo* Mikroskopie zu untersuchen. Die Planung der Experimente und die Produktion der lentiviralen Partikel wurden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Martin Biel, vor allem mit Dr. Stykianos Michalakis durchgeführt. In einem ersten Schritt musste dazu die Expression der Zielgene auf Neurone beschränkt werden. Entsprechend der Publikation von Dittgen *et al.*, 2004 kann dies durch neuronenspezifische Promotoren erreicht werden. Ein Plasmid mit der Sequenz des murinen Promotors der α -Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) wurde vom Labor von Pavel Osten bereitgestellt, welches als Grundlage für die PCR-Amplifikation der beiden Promotorabschnitte CaMKII(0,4kb) und CaMKII(1.3kb) diente (Dittgen *et al.*, 2004). Die jeweiligen Primer waren zusätzlich mit den Restriktionsschnittstellen für die Enzyme ClaI und AgeI versehen, mit deren Hilfe die entsprechenden Promotorsequenzen in einen lentiviralen GFP-Transfervektor

(Addgene plasmid 12252) eingefügt wurden. Die resultierenden Transfervektoren LV-CaMKII(0,4kb)-GFP und LV-CaMKII(1,3kb)-GFP wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert und entsprechende Viruspartikel hergestellt (Tiscornia *et al.*, 2006). Während die Produktion der LV-CaMKII(0,4kb)-GFP-Viren einen sehr geringen Titer ergab,

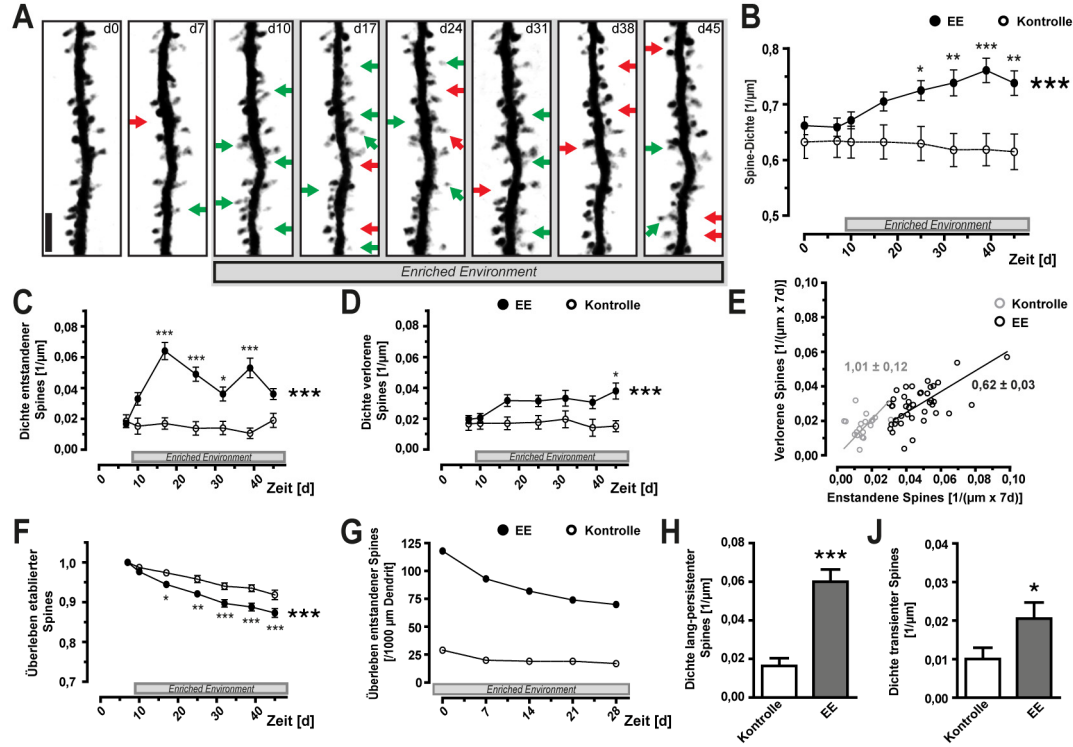


Abbildung 13. Das akute *Enriched Environment* induziert strukturelle Plastizität an basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen. (A) Repräsentativer Dendritenabschnitt zu d0 und d7 unter Kontrollbedingungen und anschließender Stimulation durch das *Enriched Environment* (grau unterlegt). Die grünen Pfeile markieren alle neu entstandenen Spines und die roten Pfeile die verloren gegangenen Spines. (Maßstabsleiste 5μm) (B-D) Es wurden bei der *Enriched Environment* Gruppe 41 basale Dendritenabschnitte von insgesamt fünf Mäusen und bei den Kontrollen 18 Dendritenabschnitte von vier Mäusen ausgewertet. Die Spine-Dichte (B) sowie die Dichte der entstandenen (C) und der verloren gegangenen Spines (D) erhöhen sich durch das *Enrichment* analog zu den beschriebenen Ergebnissen für die apikalen Dendriten der Schicht V Neurone. (E) Aufgetragen wurden die durchschnittlichen Dichten der entstandenen Spines innerhalb der ersten vier Wochen im *Environmental Enrichment* gegen die durchschnittlichen Dichten der verlorenen Spines für jeden einzelnen Dendriten. (F) Etablierte Spines, die zu den ersten beiden Zeitpunkten stabil sind, gehen zu einem größeren Anteil durch die Wirkung des *Enriched Environments* verloren. (G) Das Überleben von 114 entstandenen Spines (an 1246μm Gesamtdendrit), welche an den ersten zwei Beobachtungszeitpunkten im *Enriched Environment* gebildet wurden, wurde über die sich anschließenden vier Beobachtungszeitpunkte verfolgt und mit den 23 entstandenen Spines (an 785μm Gesamtdendrit) der Kontrolltiere verglichen. (H) Von den durch das *Enriched Environment* induzierten neuen Spines werden über die folgenden 28 Tage mehr Spines stabilisiert (J). Auch der Anteil der transienten Spines ist in der *Enriched*-Gruppe erhöht. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; *** $P > 0,001$, ** $P > 0,01$, * $P > 0,05$)

konnten hochkonzentrierte Lösungen mit LV-CaMKII(1,3kb)-GFP-Partikeln mit einem Titer in der Größenordnung von etwa 2×10^9 infektiösen Partikeln pro Milliliter gewonnen werden. Diese Viruspartikel wurden schließlich in einen ersten Versuch *in vivo* getestet. Mithilfe eines Stereotakts, der mit einem Mikromanipulator und skalierten Pitpetten ausgestattet war, wurden im Verlauf der Operation für kraniale Fenster lentivirale Partikel kortikal in einer Tiefe von 350-450µm injiziert (Cetin *et al.*, 2006). Nach der gewohnten dreiwöchigen Erholungsphase wurde mit der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie die Effizienz der virusbasierten Transfektion überprüft (Abbildung 14A). Es exprimierten ausschließlich Neurone das GFP, wobei die Expression stark genug war, um *in vivo* auch kleine Verzweigungen und einzelne dendritische Spines aufzunehmen. Allerdings war mit der eingesetzten Viruspartikelmenge die Dichte der markierten Zellen so hoch, dass einzelne Dendritenabschnitte nur sehr selten aufgelöst werden konnten. Es wurden mit der verwendeten Injektionstiefe vorrangig Neurone der kortikalen Schicht V markiert, wobei auch zahlreiche Schicht II/III Neurone das Transgen exprimierten. Zusammenfassend ist dieses virale Transfektionssystem somit neuronenspezifisch, eignet sich für die Zwei-Photonen-Mikroskopie und kann für komplexere Fragestellungen adaptiert werden.

Die GFP-Expression wurde *ex vivo* auf Gehirnschnitten kontrolliert (Abbildung 14B). In der Tat wurden ausschließlich Neurone in einem Radius von etwa 300µm um die Injektionsstelle fluoreszenzmarkiert. Ein starkes Signal fand sich in den apikalen Dendriten und den Axonen, die primär in das Striatum und den Thalamus projizieren (Aronoff *et al.*, 2010). Eher zufällig konnte beobachtet werden, dass Axone auch in den kontralateralen somatosensorischen Kortex projizieren und sich dort sehr vereinzelt in der Schicht I darstellten (Abbildungen 14C und 14D) (Ivy *et al.*, 1979). Da die strukturelle Plastizität von Axonen bis dato nur in wenigen Publikationen beschrieben war, wurde im Folgenden versucht, diese mit der *in vivo* Mikroskopie eingehender zu charakterisieren. Dazu wurden LV-CaMKII(1,3kb)-GFP-Partikel in den somatosensorischen Kortex kontralateral zum kranialen Fenster von C57Bl/6J Mäusen injiziert. Es wurde eine Injektionstiefe von 150-250µm gewählt, um möglichst ausschließlich kontralateral projizierende Schicht II/III Neurone zu transfizieren. Drei Wochen nach Virusapplikation konnten einzelne Axonabschnitte *in vivo* aufgenommen und über einen Zeitraum von 27 Tagen verfolgt werden (Abbildung 14E). Gegenüber dendritischen Spines waren vor allem die kleinen *En-passant*-Boutons schwer vom Axon abzugrenzen und als eigene Strukturen zu definieren. Dennoch schien ein Großteil der Boutons, ähnlich wie Spines, über einen Zeitraum von Wochen relativ stabil zu sein, während vereinzelt Boutons verloren gingen oder neu gebildet wurden. Verglichen mit der Dendriten-Mikroskopie musste sehr viel mehr Anregungsenergie aufgebracht werden, um die feinen Axone aufzunehmen. Daher wurde auch vermehrt ein sogenanntes *beading* der Strukturen, ein perlenschnurähnliches Aufschwellen, beobachtet, was auf phototoxische Effekte deutete (Abbildung 14E).

Kontralaterale Projektionen von Schicht II/III Neuronen bilden mit apikalen Dendriten von Schicht II/III und Schicht V Neuronen Synapsen aus (Petreanu *et al.*, 2007). Folglich sollte in YFP-H Mäusen mit kontralateral injizierten LV-CaMKII(1,3kb)-GFP-Partikeln überprüft werden, ob sich prä- und postsynaptische Strukturen einer einzelnen Synapse mikroskopieren lassen. Mithilfe der

entsprechenden Bandpassfilter war es möglich die YFP-markierten dendritischen und die GFP-markierten axonalen Strukturen voneinander zu trennen (Abbildung 14F). Eine unmittelbare räumliche Nähe von dendritischen Spines und axonalen Boutons konnte nur sehr selten gefunden und der in Abbildung 14F dargestellte Fall ist das wahrscheinlichste Beispiel einer beidseitig markierten Synapse. Allerdings fehlt selbst hier der Beweis, dass die beiden Strukturen tatsächlich funktionell in Kontakt stehen.

Zusammenfassend stellt die Lentivirus-basierte Fluoreszenzmarkierung prinzipiell eine Möglichkeit dar, kontralaterale Axone *in vivo* zu mikroskopieren, auch wenn die Handhabung komplizierter als für dendritische Spines ist und man deutlich vorsichtiger mikroskopieren muss. Für ein paralleles Aufnehmen von Prä- und Postsynapse ist das Verfahren unter den gegebenen technischen Voraussetzungen nicht geeignet.

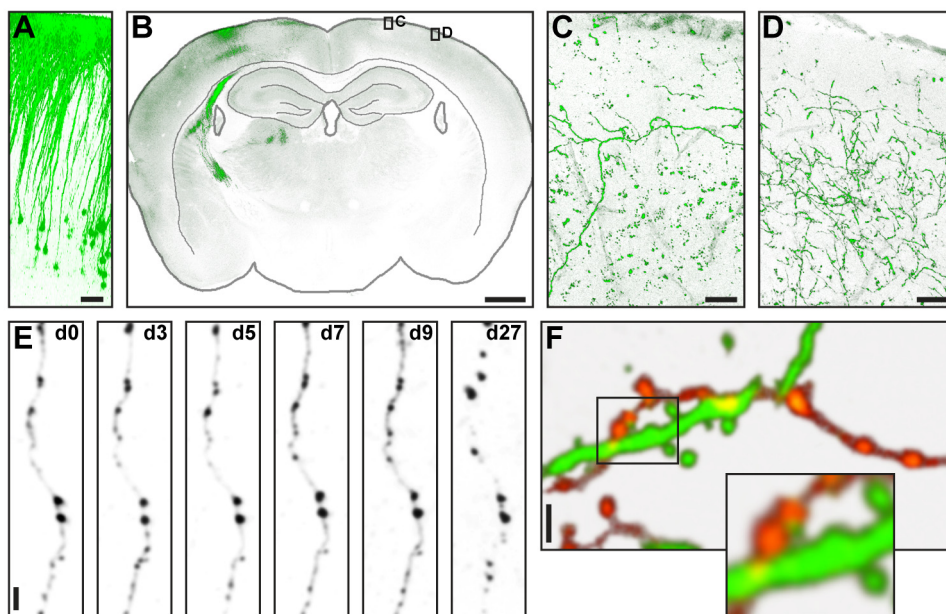


Abbildung 14. Die Lentivirus-basierte Expression von GFP in kortikalen Neuronen ermöglicht das *in vivo* Mikroskopieren von Axonen. (A) Seitliche Ansicht einer Projektion einer Bildreihe über 600µm durch den somatosensorischen Kortex, die *in vivo* mikroskopiert wurde. Stereotaktisch wurden 200nl einer 2×10^9 Einheiten/ml Lösung lentiviraler Partikel mit dem Transfervektor LV-CaMKII(1,3kb)-GFP in einer Tiefe von 350-450µm injiziert. Kortikale Schicht V und einige Schicht II/III Neurone exprimieren das GFP. (Maßstabsleiste 50µm) (B-D) Auf dem koronaren Schnitt wird die GFP-Gesamtexpression deutlich. (B) Die transfizierten Neurone des somatosensorischen Kortex projizieren ins Striatum und in den Thalamus. (Maßstabsleiste 1mm) (C-D) Die vergrößerten Teilausschnitte zeigen die kontralateral projizierenden Axone. (Maßstabsleiste 25µm) (E) Nach kontralateraler Applikation der Viruspartikel lassen sich Axone mit den Boutons repetitiv *in vivo* mikroskopieren. Allerdings ist die Gefahr phototoxischer Effekte wie dem *beading* an Tag 27 erhöht. (Maßstabsleiste 5 µm) (F) Die kontralaterale Injektion der LV-CaMKII(1,3kb)-GFP Viruspartikel in YFP-H Mäuse ermöglicht das parallele Mikroskopieren von dendritischen Spines (grün) und axonalen Boutons (rot). Vergrößert hervorgehoben wurde eine mutmaßlich prä- und postsynaptisch doppelmarkierte Synapse. (Maßstabsleiste 5µm)

4.1.6 Der Effekt eines akuten *Enriched Environments* auf kontralateral projizierende Axone von Neuronen des somatosensorischen Kortex

Parallel zu den dendritischen Spines wurde versucht, den Einfluss des *Enriched Environments* auf kontralaterale Axone des somatosensorischen Kortex, die wie oben beschrieben mit lentiviralen LV-CaMKII(1,3kb)-GFP-Partikeln fluoreszenzmarkiert wurden, zu bestimmen. Da während des Experiments mehrere Mäuse aufgrund phototoxischer Effekte und anderer technischer Schwierigkeiten aus dem Versuch genommen werden mussten, konnte in die Auswertung letztlich nur eine Maus mit sieben Axonen einbezogen werden. Insofern sind diese Ergebnisse als exemplarisch und vorläufig zu betrachten.

Auch für die Axone wurde ein Basisstatus unter Kontrollbedingungen ermittelt, bevor die entsprechende Maus in das *Enriched Environment* umgesetzt wurde. Für die exemplarisch ausgewerteten Axone stieg die Bouton-Dichte dabei von $0,19 \pm 0,01/\mu\text{m}$ innerhalb von 25 Tagen im *Enriched*-Käfig um 25% auf $0,24 \pm 0,02/\mu\text{m}$ an (Abbildung 15). Auch die Dichte der gebildeten und der verlorenen Boutons schien dabei erhöht zu sein. Auf generelle sensorische Stimulation zeigten die kontralateralen Axone der Neurone des somatosensorischen Kortex somit eine ähnliche Plastizität wie die Dendriten dieser Neurone.

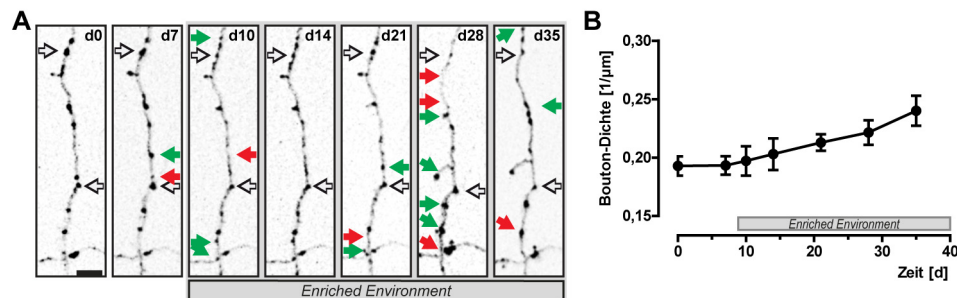


Abbildung 15. Ein akutes *Enriched Environment* induziert vermutlich strukturelle Plastizität an kontralateral projizierenden Axonen. Neurone des somatosensorischen Kortex wurden Lentivirus-basierend mit LV-CaMKII(1,3kb)-GFP-Partikeln transfiziert und kontralateral projizierende Axone *in vivo* mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie verfolgt. (A) Dargestellt ist ein repräsentativer axonaler Abschnitt, der vor (d0 und d7) und während der sensorischen Stimulation durch das *Enriched Environment* mikroskopiert wurde. Die schwarz-weißen Pfeile markieren exemplarisch axonale Boutons, die über den Beobachtungszeitraum stabil bleiben, grüne Pfeile markieren entstandene Boutons und rote Pfeile heben die Positionen hervor, an denen ein Bouton verloren gegangen war. (Maßstabsleiste 5µm) (B) Bedingte Quantifizierung der Dichte axonaler Boutons für sieben Axone einer Maus. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Anzahl an ausgewerteten Axonen verzichtet. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar.)

4.2 Der Einfluss des Amyloid-Vorläuferproteins APP auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines in jungen Tieren

Das vom Amyloid-Vorläuferprotein (APP) abgespaltene A β -Peptid ist von zentraler Bedeutung für die Pathophysiologie der Alzheimerschen Erkrankung und unmittelbar für eine verminderte synaptische Übertragung und den Verlust von dendritischen Spines verantwortlich (Hsieh *et al.*, 2006; Kamenetz *et al.*, 2003). APP selbst scheint ebenfalls für die Bildung von Synapsen und die Ausbildung dendritischer Spines wesentlich zu sein, auch wenn diese Funktion kontrovers diskutiert wird (Hoe *et al.*, 2012). In unserem Labor wurde in vier bis sechs Monate alten Mäusen, in denen entweder eine Kopie oder beide Kopien des APP-Gens deletiert waren, eine dosisabhängige Zunahme der dendritischen Spines gefunden (Bittner *et al.*, 2009). Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, wurde im Folgenden der Status der Spines in jungen Mäusen in Abhängigkeit von der APP-Expression analysiert. Im sich entwickelnden murinen Kortex ist die Dichte dendritischer Spines relativ hoch und senkt sich graduell bis zu einem Alter von zwei Monaten. Ab diesem Alter bleibt die Spine-Dichte konstant (Holtmaat *et al.*, 2005). Da in jungen Wildtyp-Mäusen ein ähnlicher Wert für die Spine-Dichte beschrieben wurde, wie er bei Bittner *et al.*, 2009 für adulte APP-*knockout* Tiere gefunden wurde, sollte überprüft werden, ob der entwicklungsbedingte Spine-Rückgang abhängig von APP ist.

Vorab musste die Operation des kranialen Fensters an jungen Tieren etabliert werden. Die Expression des YFP in kortikalen Neuronen beginnt in der YFP-H Linie ab einem Alter von zwei

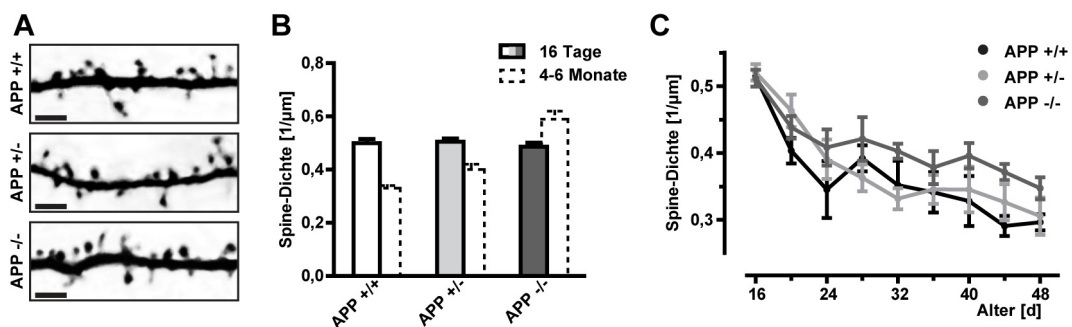


Abbildung 16. Der Verlust von APP führt zu keiner Veränderung der Dichte dendritischer Spines in jungen Tieren. (A) Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahme sich verzweigender apikaler Dendriten im somatosensorischen Kortex von 16 Tage alten YFP-H Tieren, die einen vollständigen (APP^{-/-}) oder heterozygoten (APP^{+/-}) Verlust von APP hatten oder diesbezüglich Wildtyp (APP^{+/+}) waren. (Maßstabsleiste 5 μ m) (B) Quantifizierung der *in vivo* mikroskopierte Spine-Dichte an Tag 16 von 70 Dendriten für APP^{+/+}, 36 Dendriten für APP^{+/-} und 60 Dendriten für APP^{-/-} in jeweils fünf Mäusen. Gestrichelt hinterlegt ist der entsprechende Wert der Spine-Dichte bei vier bis sechs Monate alten Tieren nach Bittner *et al.*, 2009. (C) Der physiologische Rückgang der Dichte von Spines während der postnatalen Entwicklung wurde für APP^{+/+} (26 Dendriten in drei Mäusen), APP^{+/-} (29 Dendriten in drei Mäusen) und APP^{-/-} (25 Dendriten in drei Mäusen) verfolgt. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar.)

Wochen (Abbildung 25). Entsprechend Holtmaat *et al.*, 2005 wurden daher 14 Tage alte Mäuse operiert, die bereits zwei Tage später das erste Mal *in vivo* mikroskopiert wurden. Dendriten konnten über einen Zeitraum von einem Monat verfolgt werden, obwohl die Qualität der Aufnahmen schwankte. Zum ersten Beobachtungszeitpunkt war die Bildqualität in der Regel gut, ließ dann aber für etwa zwei Wochen deutlich nach, bevor das kraniale Fenster wieder klarer wurde (Abbildung 28). Die Spine-Dichte von YFP-H Tieren, die für APP homo- oder heterozygot *knockout* oder Wildtyp waren, wurde *in vivo* an Tag 16 ermittelt. Sowohl die homozygoten als auch die heterozygoten jungen APP-*knockout* Mäuse waren hinsichtlich ihrer Spine-Dichte nicht von den Wildtyp-Tieren zu unterscheiden (Abbildungen 16A und 16B). Ein Teil der Dendriten konnte über die folgenden 32 Tage beobachtet werden. Auch wenn der entwicklungsbedingte Rückgang der Spines in den APP-*knockout* Mäusen tendenziell schwächer war, erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz. Folglich hatte der Verlust von APP im Kortex junger Mäuse keinen Effekt auf die Dichte dendritischer Spines.

4.3 Der Einfluss von Präsenilin1 auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Präseniline bilden die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase (De Strooper *et al.*, 1998; Wolfe *et al.*, 1999) und Mutationen in den Präsenilinen sind die häufigste Ursache für die frühzeitig auftretende familiäre Form der Alzheimerschen Erkrankung (FAD) (Tanzi und Bertram, 2001). Transgene Mausmodelle, die FAD-mutierte humane Varianten des Präsenilin1 (PS1) exprimieren, zeigen allerdings keine A β -Pathologie. Vielmehr wurde in verschiedenen Studien herausgefunden, dass diese Mausmodelle eine verbesserte synaptische Übertragung aufweisen (Auffret *et al.*, 2009; Dewachter *et al.*, 2008; Parent *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2001; Zaman *et al.*, 2000).

4.3.1 Effekte auf die Dichte dendritischer Spines in PS1-transgenen Mäusen in Abhängigkeit von der kortikalen Schicht

Um die Rolle von PS1 auf dendritische Spines kortikaler Neuronen zu untersuchen, wurden Mäuse die entweder transgen für humanes Wildtyp-PS1 (hPS1) oder für humanes PS1 mit der FAD-Mutation A246E (FAD-PS1) waren, mit YFP-H Mäusen verkreuzt. Entsprechend einer früheren Studie sind die Expressionslevel des humanen PS1 in der hPS1-Linie etwa doppelt so hoch wie in den FAD-PS1-Mäusen (Dewachter *et al.*, 2008). Um innerhalb der jeweiligen Linie eine homogen

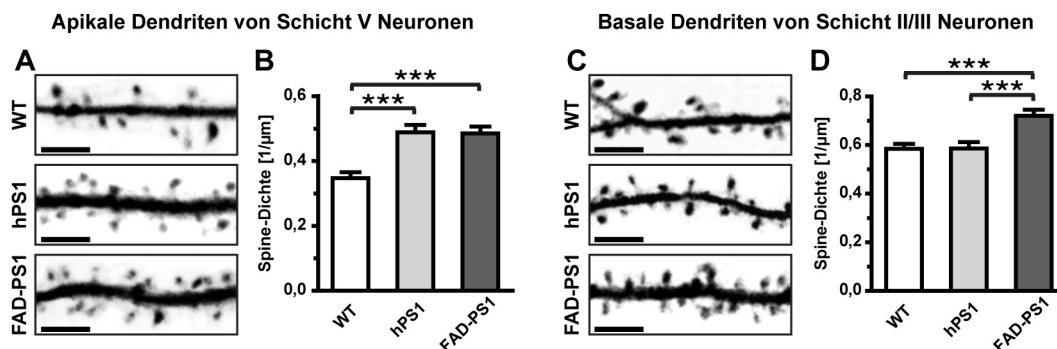


Abbildung 17. Die Dichte dendritischer Spines ist in Abhängigkeit von der kortikalen Schicht in PS1-transgenen Mäusen erhöht. Zwei-Photonen-mikroskopische *in vivo* Analyse der Dichte dendritischer Spines von Wildtyp-Kontrollen (WT) und von Mäusen, die humanes Wildtyp-PS1 (hPS1) oder FAD-mutierte PS1 (FAD-PS1) überexprimierten, jeweils in einem Alter von sechs bis acht Monaten. (A, C) Repräsentative Dendritenabschnitte sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen (A) und basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen (C). (Maßstabsleiste 5μm) (B, D) Quantifizierungen der Spine-Dichten der entsprechenden Dendriten. In (B) wurden für WT 52 Dendriten in fünf Mäusen, für hPS1 66 Dendriten in sechs Mäusen und für FAD-PS1 62 Dendriten in sechs Mäusen analysiert. In (D) wurden für WT 22 Dendriten in fünf Mäusen, für hPS1 28 Dendriten in sechs Mäusen und für FAD-PS1 25 Dendriten in sechs Mäusen analysiert. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; *** $P > 0,001$)

hohe Expression des PS1-Transgens zu gewährleisten, wurden die YFP-H-positiven Nachkommen mittels *real-time* PCR genotypisiert (Abbildung 26). Homozygote Weibchen im Alter von sechs bis acht Monaten wurden für die *in vivo* mikroskopische Analyse verwendet. Die Dichte dendritischer

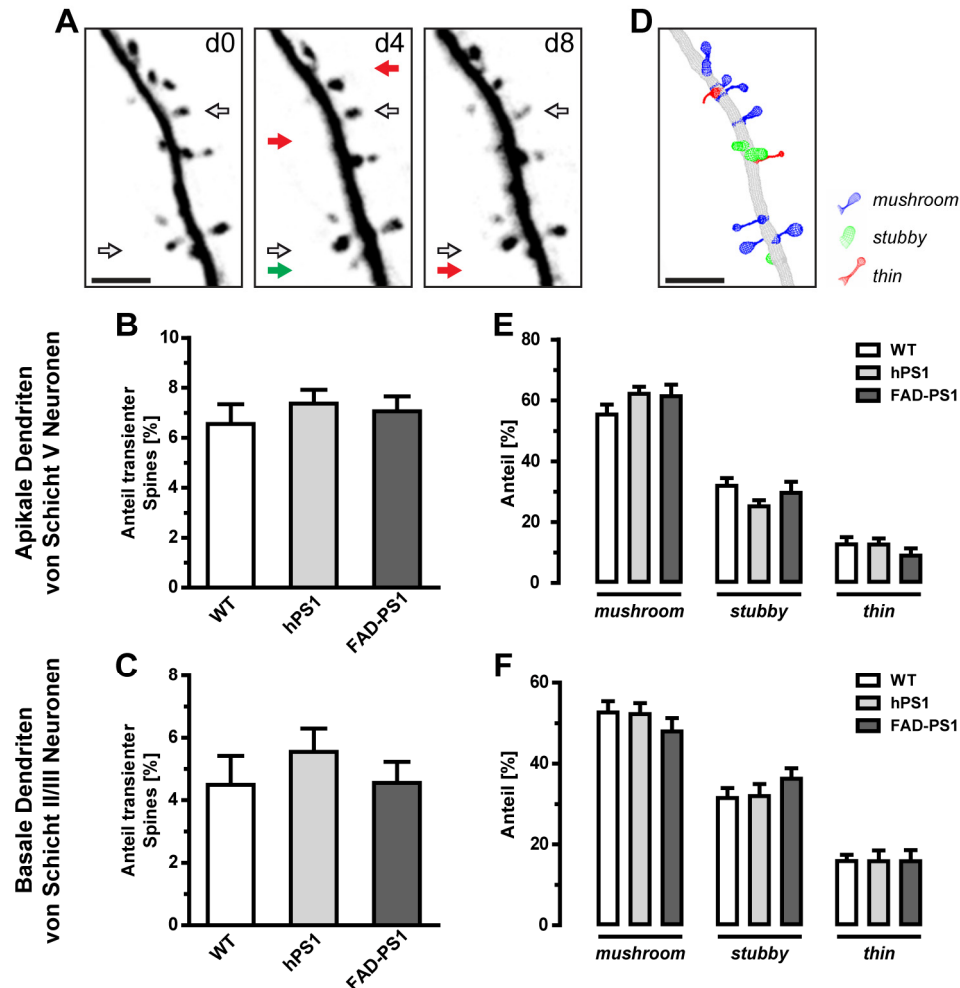


Abbildung 18. Kinetische und Form-abhängige Klassifizierungen dendritischer Spines für hPS1 und FAD-PS1 überexprimierende Mäuse. (A) Repetitives *in vivo* mikroskopieren desselben Dendriten ermöglicht die Identifizierung transients Spines. Exemplarisch wurden Spines markiert, die über den Beobachtungszeitraum stabil waren (schwarz-weiße Pfeile), die neu gebildet wurden (grüne Pfeile) oder die verloren gingen (rote Pfeile). (Maßstabsleiste 5µm) (B, C) Quantifizierung transients Spines (B) sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen für WT (48 Dendriten in fünf Mäusen), hPS1 (66 Dendriten in sechs Mäusen) und FAD-PS1 (54 Dendriten in sechs Mäusen) und (C) basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen für WT (14 Dendriten in fünf Mäusen), hPS1 (23 Dendriten in fünf Mäusen) und FAD-PS1 (16 Dendriten in sechs Mäusen). (D) Mithilfe der Bildanalyse-Software Imaris (Bitplain) wurden dendritische Spines semiautomatisch aufgrund ihrer dreidimensionalen Ausmaße als *mushroom*, *stubby* oder *thin* klassifiziert. (Maßstabsleiste 5µm) (E, F) Vergleich der Spine-Klassen für jeweils 15 sich verzweigende apikale Dendriten von Schicht V Neuronen (E) beziehungsweise für jeweils 12 basale Dendriten von Schicht II/III Neuronen (F). (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar)

Spines im somatosensorischen Kortex sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen war sowohl in hPS1-Mäusen als auch in FAD-PS1-Mäusen um etwa 40% und damit signifikant erhöht, verglichen mit Wildtyp Kontrollen (Abbildungen 17A und 17B). Zwischen den beiden PS1-transgenen Mauslinien wurde kein Unterschied für die Spine-Dichte der Schicht V Neurone gefunden (Abbildungen 17A und 17B). Im Gegensatz dazu war die Spine-Dichte der basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen nur in den FAD-PS1-Tieren erhöht. (Abbildungen 17C und 17D). Die Spine-Dichte der basalen Schicht II/III Dendriten in den hPS1-Mäusen entsprach den Kontrollwerten (Abbildungen 17C und 17D). Somit ist der Einfluss von überexprimiertem humanem PS1 abhängig von der Art der beobachteten Dendriten.

4.3.2 Kinetische und Form-abhängige Klassifizierung dendritischer Spines in PS1-transgenen Mäusen

Für eine Klassifizierung der dendritischen Spines in den PS1-überexprimierenden Mäusen in transiente und persistente Spines wurden dieselben Dendritenabschnitte über einen Zeitraum von 8 Tagen verfolgt (Abbildung 18A). Es konnten sowohl für sich verzweigende apikale Dendriten von Schicht V Neuronen als auch für basale Dendriten von Schicht II/III Neuronen keine Unterschiede zwischen Wildtyp-, hPS1- und FAD-PS1-Mäusen hinsichtlich des Anteils an transienten Spines festgestellt werden (Abbildungen 18B und 18C).

Eine weitere Möglichkeit, dendritische Spines zu klassifizieren, stellt die Einteilung in *mushroom*, *stubby* und *thin* dar (Peters und Kaiserman-Abramof, 1970), die sich auf die Form der Spines bezieht. Mithilfe einer Software-basierten dreidimensionalen Formanalyse wurde diese Klassifizierung semiautomatisch für einen ausgewählten Anteil der *in vivo* mikroskopierte Dendriten durchgeführt (Abbildung 18D). Obwohl für die basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen etwas weniger *mushroom*-Spines und etwas mehr *thin*-Spines als für die sich verzweigenden apikalen Dendriten der Schicht V Neurone gefunden wurden, konnte zwischen den jeweiligen Mauslinien kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildungen 18E und 18F). Eine Überexpression von humanem Wildtyp-PS1 oder der FAD-mutierten Variante hatte somit keinen Einfluss auf die Art der dendritischen Spines, zumindest nicht im somatosensorischen Kortex.

4.3.3 Prozessierung von Spine-relevanten Substraten der γ -Sekretase in PS1-transgenen Mäusen

Um den Einfluss der transgenen PS1-Überexpression auf die Dichte dendritischer Spines zu erklären, sollten die zellulären Funktionen von PS1 näher untersucht werden. Als katalytische Untereinheit der γ -Sekretase ist PS1 verantwortlich für die proteolytische Prozessierung einer

Vielzahl von Substraten, von denen einige im Zusammenhang mit der Ausbildung oder der Aufrechterhaltung synaptischer Verbindungen stehen (Wakabayashi und De Strooper, 2008). Die Aktivität der γ -Sekretase wurde analysiert, indem die Mengen der C-terminalen Fragmente (CTFs) der entsprechenden Proteine, also die direkten Substrate der proteolytischen Spaltung, auf Westernblots bestimmt wurden. Eine hypothetische Erhöhung der γ -Sekretaseaktivität würde daher zu einer Verminderung der entsprechenden CTFs führen.

Wie bereits beschrieben, ist APP selbst wesentlich für die Bildung von Synapsen und ein Verlust führt zu einer erhöhten Anzahl an synaptischen Endigungen (Bittner *et al.*, 2009; Priller *et al.*, 2006). Daher wurde der Einfluss der transgenen Überexpression von PS1 auf die Prozessierung von APP anhand der Menge der APP-CTFs in Großhirnhomogenaten der entsprechenden Mauslinien ermittelt. Der verwendete Antikörper bindet innerhalb der A β -Peptidsequenz und erkennt sowohl das nach der β -Sekretase freigesetzte APP β -CTF als auch das kleinere APP α -CTF, welches bei der α -Spaltung entsteht (Abbildung 19A). Überraschend waren die Level an APP α - und APP β -CTF für

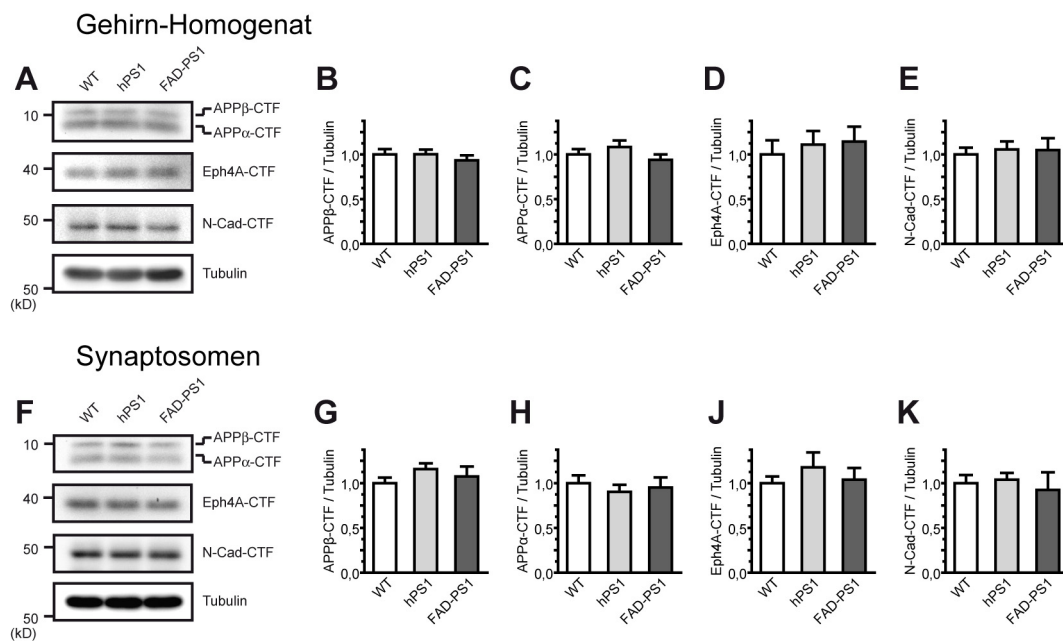


Abbildung 19. Unveränderte Prozessierung Spine-relevanter Substrate der γ -Sekretase in den PS1-transgenen Mäusen. (A) Als Maß der γ -Sekretase-Aktivität wurden in Homogenaten von Großhirngewebe sechs bis acht Monate alter Tiere die Level der C-terminalen Fragmente (CTF) von Substraten bestimmt, die wichtig für die Ausbildung oder den Erhalt von Synapsen sind. Repräsentative Immunblots mit der Detektion von APP α/β -CTFs (Antikörper CT15 von Dr. E. Koo), EphA4-CTF (sc-921 von Santa Cruz), N-Cadherin-CTF (N-Cad-CTF) (6199 von BD Biosciences) und der Ladekontrolle Tubulin (sc-51502 von Santa Cruz). (B-E) Für jede Mauslinie wurden die Großhirn-Homogenate von drei Tieren in je dreifacher Ausführung densitometrisch für (B) APP β -CTF, (C) APP α -CTF, (D) Eph4A-CTF und (E) N-Cadherin quantifiziert. (F) Synaptosomen wurden aus den Großhirn-Homogenaten präpariert und auf die oben genannten Substrate getestet. (G-K) Quantifizierung von Triplikaten dreier unabhängiger Experimente für (G) APP β -CTF, (H) APP α -CTF, (J) Eph4A-CTF und (K) N-Cadherin. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar)

beide PS1-Linien und für die Wildtyp-Kontrollen bei der Westernblotanalyse identisch (Abbildungen 19B und 19C). Ein zweiter Kandidat für die Analyse war der Ephrinrezeptor EphA4, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass die γ -Sekretase-abhängige Spaltung von EphA4 die Bildung von dendritischen Spines induziert (Inoue *et al.*, 2009). Für die EphA4-CTF Level konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den untersuchten Mauslinien festgestellt werden (Abbildung 19D). Schließlich ergab die Analyse für das dritte Substrats N-Cadherin, welches auch relevant für die Ausbildung von Synapsen ist (Mysore *et al.*, 2007), eine ähnliche Prozessierung durch die γ -Sekretase in Wildtyp-, hPS1- und FAD-PS1-Tieren (Abbildung 19E).

Zusätzlich wurden grobe Synaptosomenpräparationen angefertigt (Abbildung 33), um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede in der γ -Sekretaseaktivität sich ausschließlich auf synaptische Regionen auswirkten und es gegebenenfalls durch die Verwendung von Homogenaten von Großhirngewebe zu Verdünnungseffekten kam. Auch hier ergab die Westernblotanalyse für die CTFs von APP, EphA4 und N-Cadherin keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien (Abbildungen 19F-K). Die transgene Überexpression von hPS1 und FAD-PS1 hat somit keinen Einfluss auf die Prozessierung der untersuchten Substrate der γ -Sekretase.

4.3.4 Die Expression des Ryanoidin-Rezeptors in PS1-transgenen Mäusen

Neben der proteolytischen Funktion im γ -Sekretase-Komplex wird zunehmend die γ -Sekretase-unabhängige Rolle von PS1 in der Regulation von neuronalem Ca^{2+} diskutiert (Elder *et al.*, 2010). Um zu testen, ob die Ca^{2+} -Homöostase in den PS1-transgenen Mäusen verändert war, wurden die Expressionslevel des Ryanoidin-Rezeptors bestimmt. Die Westernblotanalyse von

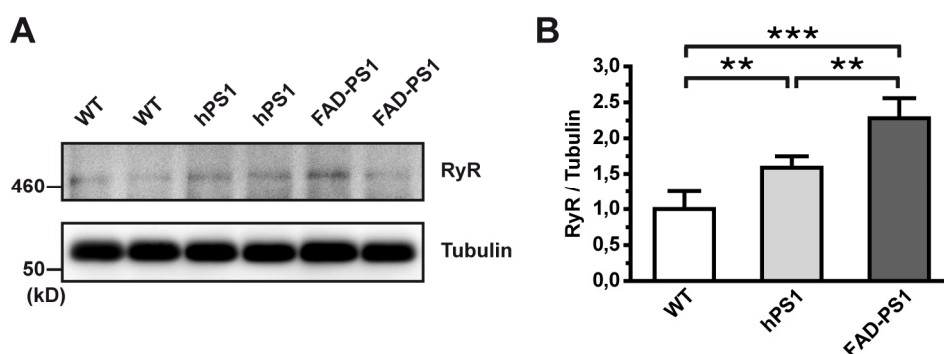


Abbildung 20. Erhöhte Expression des Ryanoidin-Rezeptors in PS1-transgenen Mäusen. (A) Westernblotanalyse der Expression des Ryanoidin-Rezeptors (RyR) (Antikörper ma3-925 von Thermo Scientific) in Großhirnhomogenaten von sechs bis acht Monate alten Tieren mit Ladekontrolle Tubulin (sc-51502 von Santa Cruz). (B) Densitometrische Quantifizierung der Immunblots relativ zur Tubulinexpression (drei unabhängige Westernblots mit drei Tieren pro analysierte Mauslinie). (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; *** $P > 0,001$, ** $P > 0,01$)

Großhirnhomogenaten ergab sowohl in den hPS1- als auch in den FAD-PS1-Tieren eine signifikant erhöhte Expression (Abbildung 20). Die Überexpression des humanen Wildtyp-PS1 war ausreichend, um das Ryanoidin-Rezeptor-Level um das 1,6-fache anzuheben (Abbildung 20B). Im Großhirn FAD-PS1-transgener Tieren betrug die Ryanoidin-Rezeptor-Expression mehr als das Doppelte, verglichen mit den Wildtyp-Kontrollen, und war damit auch signifikant höher als in den hPS1-Mäusen (Abbildung 20B). Die gesteigerte Expression des Ryanoidin-Rezeptors wurde als ein Indikator für eine gestörte neuronale Ca^{2+} -Homöostase verstanden.

4.3.5 Der Effekt einer transgener Überexpression von PS1 auf das Überleben von Schicht II/III Neuronen

In einer früheren Studie wurde in einem dreifach transgenen Mausmodell der Alzheimerschen Erkrankung, welches neben FAD-mutiertem PS1 noch mutierte Varianten von APP und Tau exprimierte, ein Verlust von kortikalen Schicht II/III Neuronen detektiert (Fuhrmann *et al.*, 2010). Da die Mäuse in einem ähnlichen Alter wie die hier verwendeten PS1-Tiere waren, wurde in letzteren zusätzlich untersucht, ob die Expression von hPS1 oder FAD-PS1 allein zu einem Nervenzellverlust führt. Mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden daher die Zellkörper von Schicht II/III Neuronen in Übersichtsaufnahmen im somatosensorischen Kortex detektiert und 30 Tage später die entsprechenden Positionen erneut aufgenommen (Abbildung 21A). Innerhalb des Beobachtungszeitraums konnte dabei weder in den PS1-transgenen Tieren noch in den Wildtyp-Kontrollen ein Nervenzellverlust beobachtet werden (Abbildung 21B). Eine ausschließliche Überexpression von hPS1 oder FAD-PS1 ist daher nicht für einen Verlust von kortikalen Neuronen der Schicht II/III ausreichend, zumindestens im untersuchten Alter von sechs bis acht Monaten.

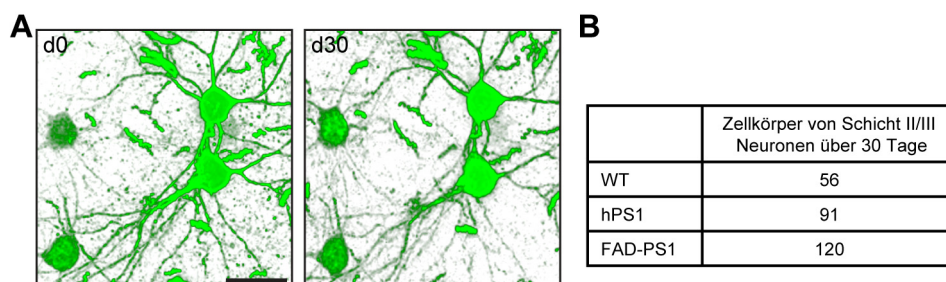


Abbildung 21. Kein Neuronenverlust bei der Überexpression von hPS1 oder FAD-PS1. (A) Mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden Zellkörper von Schicht II/III Neuronen im somatosensorischen Kortex in sechs bis acht Monate alten PS1-transgenen Mäusen und Wildtyp-Kontrollen über einen Zeitraum von 30 Tagen verfolgt. (Maßstabsleiste 10 μm) (B) In fünf Wildtyp-, fünf hPS1- und sechs FAD-PS1-Tieren konnte die jeweils angegebene Anzahl an Neuronen mikroskopiert werden. Es wurde unabhängig von der Mauslinie über den Beobachtungszeitraum kein Neuronenverlust detektiert.

4.4 Der Einfluss von BACE1 auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines

BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme 1*) ist eine neuronale Protease, die verschiedene synaptische Proteine prozessiert (Dislich und Lichtenthaler, 2012). Mäuse, denen das BACE1-Gen fehlt, sind auf den ersten Blick phänotypisch unauffällig, weisen allerdings leichte Verhaltens- und Lerndefizite auf (Laird *et al.*, 2005). Tatsächlich ist die Spine-Dichte im Hippocampus von BACE1-*knockout* Tieren vermindert (Savonenko *et al.*, 2008). Da BACE1 die vorrangige, wenn nicht sogar einzige, neuronale β -Sekretase und das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Generierung des A β -Peptids ist, stellt das Enzym ein interessantes Zielprotein für therapeutische Ansätze dar.

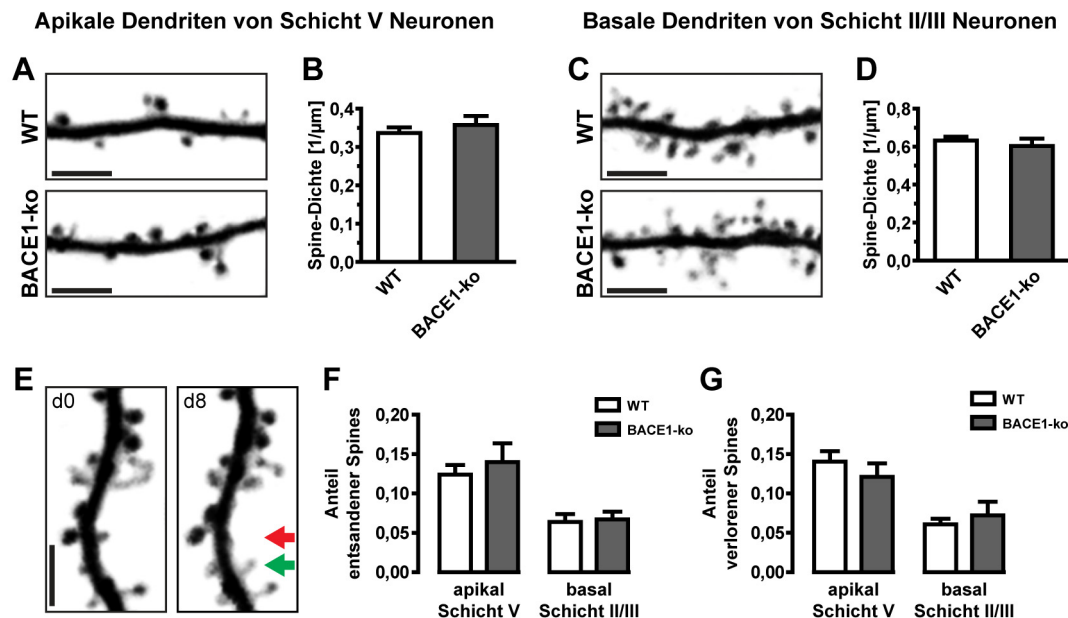


Abbildung 22. Der *knockout* von BACE1 hat keinen Einfluss auf die Spine-Dichte und die Spine-Kinetik kortikaler Dendriten im somatosensorischen Kortex. Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahme von YFP-H-positiven Dendriten im somatosensorischen Kortex von sechs Monate alten, weiblichen Mäusen, die Wildtyp oder homozygot *knockout* für BACE1 waren. (**A-D**) Es wurden sowohl sich verzweigende apikale Dendriten von Schicht V Neuronen (**A**) als auch basale Dendriten von Schicht II/III Neuronen mikroskopiert (**C**). (Maßstabsleiste 5 μ m) (**B**) Für die quantitative Auswertung der Spine-Dichte der apikalen Dendriten wurden 42 Dendriten in vier Wildtyp-Mäusen und 22 Dendriten in drei BACE1-*knockout*-Tieren analysiert. (**D**) Für die basalen Dendriten wurden 19 Dendriten von drei Wildtyp-Kontrollen und 15 Dendriten von drei BACE1-*knockout*-Tieren ausgewertet. (**E**) Die aufgenommenen Dendriten wurden über die Zeit verfolgt, um entstandene dendritische Spines (grüner Pfeil) und verloren gegangene Spines (roter Pfeil) zu identifizieren. (Maßstabsleiste 5 μ m) (**F-G**) Der Anteil der dendritischen Spines, die innerhalb des Beobachtungszeitraums von acht Tagen neu gebildet wurden (**F**) beziehungsweise verloren gingen (**G**). Die Anzahl der ausgewerteten Dendriten entspricht (**B**) beziehungsweise (**D**). (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar)

4.4.1 Der Effekt des *knockouts* von BACE1 auf dendritische Spines in adulten Mäusen

Die Dichte dendritischer Spines im somatosensorischen Kortex sechs Monate alter BACE1-*knockout* Mäuse wurde mithilfe der *in vivo* Mikroskopie gemessen und mit Wildtyp-Kontrollen verglichen (Abbildungen 22A und 22C). Auch in diesem Experiment war ein Anteil der kortikalen Neurone durch das Einkreuzen mit der YFP-H-Mauslinie fluoreszenzmarkiert. Überraschenderweise war die Spine-Dichte in den BACE1-defizienten Mäusen sowohl für sich verzweigende apikale Dendriten von Schicht V Neuronen (Abbildung 22B), als auch für basale Dendriten der Schicht II/III Neurone (Abbildung 22D) von den Kontrollen nicht zu unterscheiden. Auch hinsichtlich der Spine-Dynamiken scheint der permanente Verlust von BACE1 keinen Effekt zu haben. An beiden untersuchten Dendritenarten war der Anteil an entstandenen Spines (Abbildungen 22E und 22F) und der Anteil an verloren gegangenen Spines (Abbildungen 22E und 22G) über den Beobachtungszeitraum von acht Tagen gleich groß.

Eine Analyse der Spine-Dichte im Hippocampus von BACE1-*knockout* Mäusen war leider nicht möglich, da sich erstens hippocampale Neurone nicht mit einem herkömmlichen kranialen Fenster mikroskopieren lassen und zweitens die Fluoreszenzmarkierung in der YFP-H-Mauslinie im Hippocampus adulter Tiere so dicht ist, dass eine zuverlässige Auswertung der Spines auch *ex vivo* nicht gewährleistet war (Abbildung 3).

4.4.2 Der Effekt des *knockouts* von BACE1 auf dendritische Spines in jungen Mäusen

Um zu beurteilen, ob der Verlust von BACE1 einen Einfluss auf ein weniger etabliertes und daher plastischeres neuronales Netzwerk hat, wurden junge BACE1-*knockout*-Mäuse untersucht. Der Einfachheit halber wurde diese Analyse *ex vivo*, also an fixierten Gehirnschnitten durchgeführt. Der früheste Zeitpunkt für eine Analyse war ein Alter von 16 Tagen, da für die Markierung einzelner Neuronen wieder auf eine YFP-H-Verkreuzung zurückgegriffen wurde und die Expression des YFP erst in diesem Alter einsetzte. Im Kortex war in den verwendeten Mäusen die Expression des YFP selbst zu diesem Zeitpunkt immer noch so schwach (Abbildung 25), dass für Tag 16 eine Auswertung der Spine-Dichte ausschließlich in der CA1-Region des Hippocampus möglich war. Die apikalen Dendriten pyramidalen Neurone der CA1-Region von BACE1-defizienten Mäusen hatten an Tag 16 mit etwa 84% eine deutlich geringere Spine-Dichte als die Wildtyp-Kontrollwerte (Abbildung 23). Auch nach 32 Tagen war die Dichte der Spines in CA1 von BACE1-*knockout* Tieren noch signifikant vermindert, der Wert näherte sich den Kontrollen jedoch an (Abbildung 23). An den sich verzweigenden Dendriten von Schicht V Neuronen im Kortex zeichnete sich bei den BACE1-*knockouts* ebenfalls eine Tendenz zu einer niedrigeren Spine-Dichte ab. Der

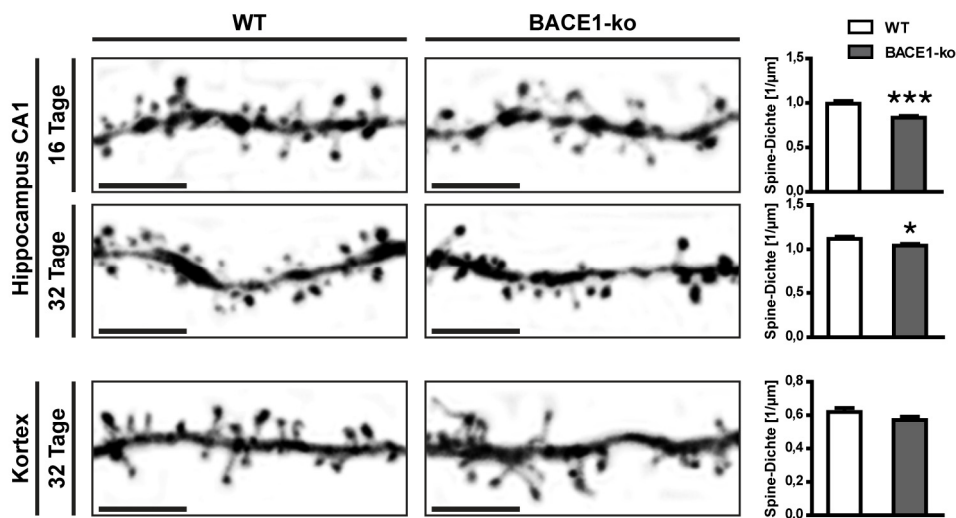


Abbildung 23. Verminderte Dichte dendritischer Spines in jungen BACE1-knockout-Mäusen. In fixierten koronaren Gehirnschnitten von 16 und 32 Tage alten YFP-H Mäusen, die für BACE1 Wildtyp oder homozygot *knockout* waren, wurde die Dichte dendritischer Spines apikaler Dendriten der pyramidalen Neurone in der hippocampalen CA1-Region und sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen im Kortex untersucht. Für die quantitative Auswertung wurden für CA1/16 Tage 45 Dendriten in vier Wildtyp-Mäusen gegen 55 Dendriten in vier BACE1-knockouts, für CA1/32 Tage 56 Dendriten in vier Wildtyp-Mäusen gegen 55 Dendriten in vier BACE1-knockouts und für Kortex/32 Tage 42 Dendriten in vier Wildtyp-Mäusen gegen 44 Dendriten in drei BACE1-knockout-Tieren analysiert. (Maßstabsleiste 5μm) (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; *** $P > 0,001$, * $P > 0,05$)

Unterschied zu den Wildtyp-Tieren war allerdings nicht signifikant (Abbildung 23). Weiterhin erschienen die dendritischen Spines in den jungen BACE1-knockouts noch nicht ausgereift und es wurden wesentlich mehr Filopodien-ähnliche Strukturen bei diesen Tieren gefunden (Abbildung 23). Diese Befunde legen nahe, dass BACE1 tatsächlich für die Ausbildung dendritischer Spines bedeutsam ist, dies möglicherweise aber nur im sehr plastischen, sich entwickelnden neuronalen Netzwerk fassbar ist.

4.4.3 Der Einfluss einer akuten pharmakologischen Inhibition von BACE1 auf dendritische Spines

Ob ein akuter Verlust der β -Sekretase einen Einfluss auf dendritische Spines hat und dieser therapeutische Ansatz für die Behandlung von Alzheimer-Patienten daher als unbedenklich eingestuft werden kann, sollte durch die Testung von BACE1-Inhibitoren im *in vivo* Zwei-Photonen-Experiment überprüft werden. BACE1 stellte sich lange Zeit als schwieriges pharmakologisches Zielprotein dar und erst kürzlich konnten erste vielversprechende inhibierende Substanzen identifiziert werden (Vassar und Kandalepas, 2011).

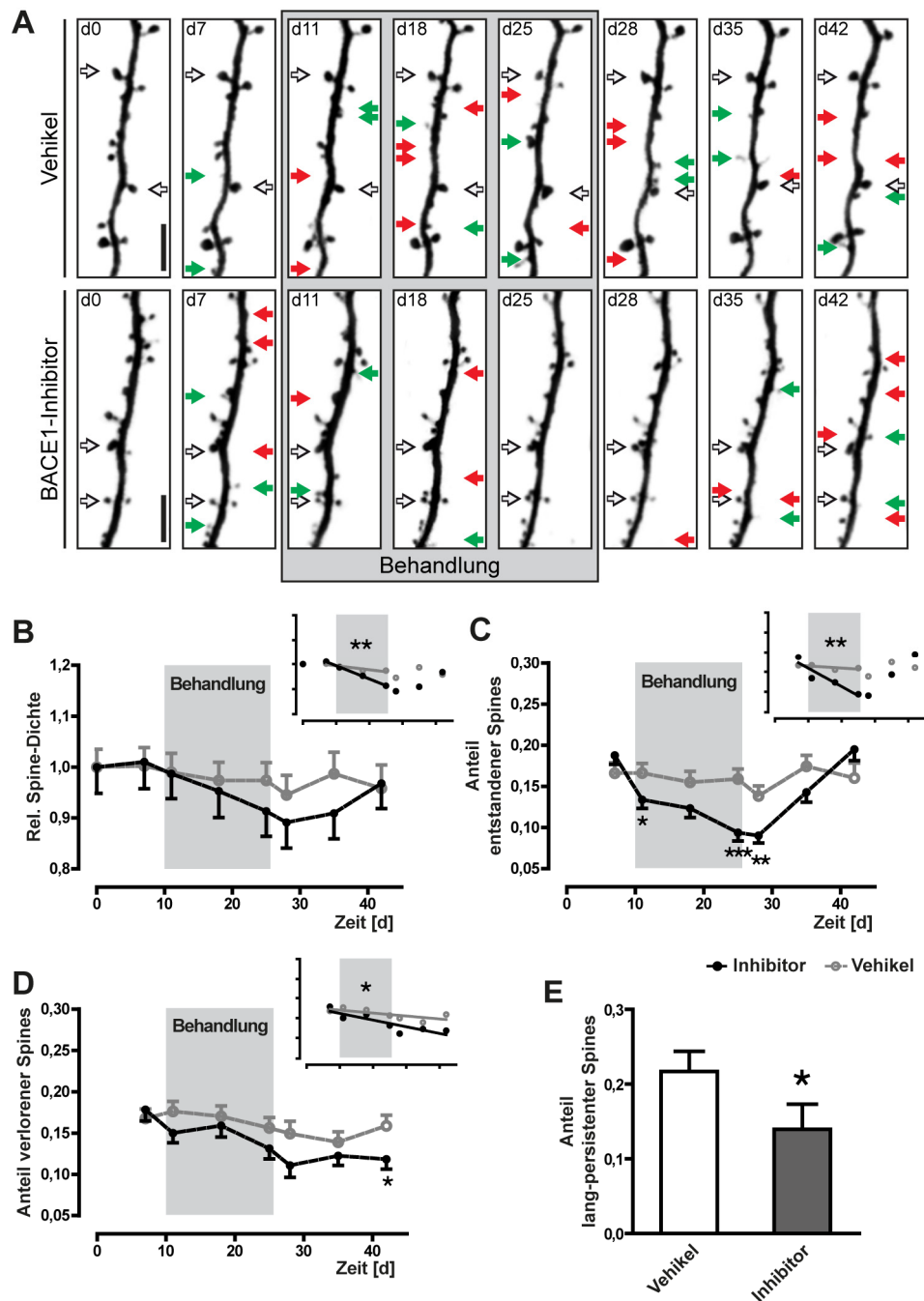


Abbildung 24. Eine akute pharmakologische Inhibition von BACE1 stört die Ausbildung neuer dendritischer Spines. Der Effekt des potenten und *in vivo* applizierbaren BACE1-Inhibitors SCH-1682496 auf dendritische Spines wurde in männlichen, drei Monate alten GFP-M-Mäusen untersucht. Dazu wurden sich verzweigende apikale Dendriten von Schicht V Neuronen vor (d0, d7), während (d11, d18, d25; grau unterlegt) und nach (d28, d35, d42) der Behandlung (von Tag 10 bis Tag 25) mit dem Inhibitor (100mg/kg Körpergewicht) beziehungsweise der Lösungsmittel-Kontrolle (Vehikel) mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie aufgenommen. **(A)** An repräsentativen Dendritenabschnitten wurden durchgehend stabile Spines (exemplarisch) mit schwarz-weißen Pfeilen, alle neu entstandenen Spines mit grünen und alle verloren gegangenen Spines mit roten Pfeilen markiert. (Maßstabsleiste 5 µm) →

In Zusammenarbeit mit der Firma Lundbeck A/S wurden zuerst verschiedene BACE1-Inhibitoren auf Ihre Effektivität und Verträglichkeit in Mäusen überprüft. Als erster Kandidat wurde der Inhibitor LY2434073 getestet, der zwei Stunden nach einmaliger Behandlung zu einer Reduktion der A β 40 Level um etwa 14% im Gehirn von Mäusen führte (Hussain *et al.*, 2007). In einem Vorexperiment mit einer Behandlung über vier Tage konnte kein Effekt auf die A β -Level im Gehirn detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies kann durch eine mögliche Metabolisierung der Substanz erklärt werden. Die Testung eines weiteren Inhibitors LY2811376 (May *et al.*, 2011) über zwei Wochen wurde von den Mäusen nicht vertragen, was sich durch Diarrhö und Gewichtsverlust bemerkbar machte. Die Testung wurde von der Firma Lundbeck A/S durchgeführt.

Als dritte Substanz wurde schließlich der Inhibitor SCH-1682496 (Scott *et al.*, 2011) (Abbildung 32) getestet (im Folgenden als BACE1-Inhibitor bezeichnet). Die Substanz kann oral appliziert werden, passiert die Blut-Hirn-Schranke und reduziert im Gehirn von Ratten die A β Level um 80% (Scott *et al.*, 2011). In Mäusen wurde nach einer akuten Dosis von 100mg/kg Körpergewicht eine Verminderung der A β 40 Level von 60% sowohl im Kortex als auch im Plasma beobachtet (Abbildungen 32C und 32D). Eine chronische Behandlung der Tiere über acht und 15 Tage hielt die A β 40 Level in Gehirn und Plasma bei 40% ohne offensichtliche Nebeneffekte (Abbildungen 32C und 32D).

Für die Zwei-Photonen-mikroskopische Analyse wurden in diesem Experiment Mäuse der GFP-M Linie eingesetzt. GFP-M Mäuse bieten den Vorteil, dass weniger kortikale Neurone fluoreszenzmarkiert sind. Daher lassen sich vereinzelte Dendriten für die mikroskopische Aufnahme besser finden und auch die Auswertung gestaltet sich einfacher. Allerdings wurden in den GFP-M-Mäusen nur sehr wenige Schicht II/III Neurone gefunden, so dass sich die Mauslinie für eine Analyse dieser Neuronenpopulation nicht eignet. Vor der 16-tägigen Behandlungsphase mit dem BACE1-Inhibitor (100mg/kg Körpergewicht) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel als Kontrolle (Vehikel), wurde der basale Spine-Status an zwei Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 24A). Die Spine-Dichte sich verzweigender apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen im somatosensorischen Kortex lag bei den GFP-M-Mäusen unter Kontrollbedingung mit $0,29 \pm 0,02/\mu\text{m}$ etwas unterhalb der Werte, die für die YFP-H-Tiere üblicherweise gemessen wurden.

(B-D) Zur quantitativen Analyse der relativen Spine-Dichte **(B)**, der neu entstandenen Spines **(C)** und der verloren gegangenen Spines **(D)** wurden 45 Dendriten von insgesamt vier Inhibitor-behandelten Mäusen und 50 Dendriten von fünf Kontroll-Tieren ausgewertet. Die großen Graphen stellen den Verlauf der untersuchten Parameter dar, für die zum jeweiligen Zeitpunkt auf signifikante Unterschiede getestet wurde. Die kleineren Graphen je rechts oben sind identische Abbildungen der Datenpunkte, verdeutlichen aber die lineare Regression über den angegebenen Beobachtungsbereich als statistische Auswertung. **(E)** Es wurde analysiert, ob dendritische Spines, die während der Behandlungsphase (an Tag 17 und Tag 25) als neu entstanden identifiziert wurden, bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt (Tag 42) überlebten und diese als lang-persistente Spines klassifiziert. (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; *** $P > 0,001$, ** $P > 0,01$, * $P > 0,05$)

Der Effekt der Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor auf die Spine-Dichte war nicht sehr ausgeprägt und erreichte am letzten Beobachtungszeitpunkt innerhalb der Behandlungsphase eine Verminderung um etwa 10% (Abbildung 24B). Allerdings folgte der Rückgang der Dichte der Spines sehr markant dem Zeitverlauf der Behandlung und resultierte in einer signifikant unterschiedlichen linearen Regression, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach der Behandlung näherte sich die Spine-Dichte wieder dem Ausgangswert an (Abbildung 24B). Wie anhand der grünen Pfeile in Abbildung 24A zu sehen, war der Effekt auf den Anteil an entstandenen Spines in der Behandlungsgruppe sehr deutlich. Bereits einen Tag nach Beginn der BACE1-Inhibition war der Anteil an neu gebildeten Spines signifikant reduziert und erreichte am Ende der Behandlung eine Verminderung an entstandenen Spines um mehr als 40% (Abbildung 24C). Auch die Bildung neuer Spines kehrte nach Beendigung der BACE1-Inhibition wieder auf den Basiswert zurück, was einen reversiblen Effekt nahe legt. Der Verlauf für den Anteil an verloren gegangenen Spines folgte einer anderen Kinetik. Der Verlust dendritischer Spines nahm langsam und über die Behandlungsphase hinaus ab (Abbildung 24D). Erst eine lineare Regression über den ganzen Beobachtungszeitraum offenbarte einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Da ein großer Teil der neu gebildeten Spines transient ist und innerhalb kurzer Zeit wieder untergeht, kann der Effekt für die verloren gegangenen Spines in Abbildung 24D als sekundäre Folge des Verlustes neu gebildeter Spines verstanden werden. Alternativ könnte auch ein homöostatischer Mechanismus für den verzögerten Verlust von Spines verantwortlich sein (siehe Diskussion). Die Kontrollbehandlung mit dem Vehikel allein hatte auf die Spine-Dichte und den Anteil an entstandenen und verloren gegangenen Spines keinen Einfluss (Abbildungen 24A-D). Schließlich wurde das Schicksal der dendritischen Spines näher analysiert, die trotz der BACE1-Inhibitor-Behandlung neu entstanden waren. Daher wurden Spines, die am neunten und am sechzehnten Behandlungstag als neu gebildet identifiziert wurden, über die Zeit verfolgt und es wurde registriert, ob diese Spines bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt überlebten. In der Inhibitorgruppe waren signifikant weniger neu gebildete Spines über diesen Zeitraum stabil als in der Kontrollgruppe (Abbildung 24E). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine akute Inhibition von BACE1 im Kortex adulter Mäuse die Bildung neuer Spines beeinträchtigt.

5 Diskussion

5.1 *Enriched Environment* und dendritische Spines

In der vorliegenden Arbeit hatte eine generelle sensorische Stimulation durch ein *Enriched Environment* einen signifikanten Einfluss auf die dendritischen Spines kortikaler Neurone. Sowohl bei Mäusen, die seit ihrer Geburt im *Enriched Environment*-Käfig gehalten wurden, als auch bei akut stimulierten Tieren konnte eine Zunahme der Spine-Dichte beobachtet werden. Außerdem erhöhte sich die Dichte der neu entstandenen und der verloren gegangenen Spines. Neu gebildete Spines wurden vermehrt stabilisiert und das akute *Enriched Environment* führte zu einem Verlust von bisher etablierten Spines. Diese Effekte wurden an beiden untersuchten Dendritenpopulationen gefunden, an den sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen und an den basalen Dendriten von Schicht II/III Dendriten. Die Beobachtungen sprechen dafür, dass substantielle und lang anhaltende Veränderungen des neuronalen Netzwerks durch ein *Enriched Environment* induziert werden.

Der Einfluss eines *Environmental Enrichments* wurde in Ratten und Mäusen bereits *post mortem* in verschiedenen Hirnregionen untersucht. In unterschiedlichen Arealen des cerebralen Kortex (Gelfo *et al.*, 2009; Kolb *et al.*, 2003; Leggio *et al.*, 2005), als auch im Hippocampus (Rampon *et al.*, 2000) und im Striatum (Comery *et al.*, 1995) konnte eine erhöhte Dichte dendritischer Spines festgestellt werden. Im Kortex waren die Befunde weitestgehend übereinstimmend für apikale und basale Dendriten pyramidalen Neurone. Nur in einer Studie konnte kein Effekt auf die Spine-Dichte an den apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen im parietalen Kortex ausgemacht werden (Gelfo *et al.*, 2009). Auch bei Primaten, genauer bei Krallenaffen, resultierte eine komplexere Umgebung ebenfalls in einer erhöhten Dichte von Spines im präfrontalen Kortex und im Hippocampus (Kozorovitskiy *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen konnten mit den in dieser Arbeit vorgestellten *in vivo* mikroskopischen Daten in der Maus bestätigt werden. Da mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie der Effekt des akuten *Enriched Environments* direkt und zeitlich aufgelöst beobachtet wurde, sind die hier vorgestellten Ergebnisse als sehr zuverlässig und aussagekräftig zu bewerten.

Darüber hinaus liefert die *in vivo* Mikroskopie natürlich wichtige Informationen über die Dynamik dendritischer Spines, die mit dem *ex vivo* Ansatz nicht gewonnen werden können. Mit der Methode wurde bereits vielfach die Neubildung und der Verlust von Spines als Folge sensorischer Manipulation beobachtet (Fu und Zuo, 2011). Während bei der Mehrzahl der Studien sensorische

Reize auf unphysiologische Weise unterdrückt wurden, wurde erst in neueren Studien auch der Einfluss konkreter physiologischer Lernerfahrungen untersucht (Fu *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, führte eine permanente Stimulation der Vibrissen bei Yang *et al.*, 2009 zu einem schnellen Anstieg neu entstandener Spines und einem erhöhten Verlust bereits etablierter Spines im somatosensorischen Kortex. Eine Verdopplung der Bildung neuer Spines wurde im motorischen Kortex von Mäusen gemessen, die in einem speziellen Käfig ausgiebige Möglichkeiten zu motorischem Training hatten (Fu *et al.*, 2012). Diese und weitere Studien bestätigen das Ausmaß und den zeitlichen Verlauf der hier beschriebenen Veränderungen an dendritischen Spines. Dass das *Enriched Environment* auch sehr schnell zu funktionellen Veränderungen im somatosensorischen Kortex führt, konnte in einer elektrophysiologischen Studie belegt werden. So wurde eine erhöhte synaptische Übertragung bei Ratten bereits nach 15 bis 24 Stunden im *Enriched*-Käfig beobachtet (Rema *et al.*, 2006).

Alle bisherigen *in vivo* mikroskopischen Arbeiten zu kortikalen dendritischen Spines beziehen sich ausschließlich auf apikale Dendriten, hauptsächlich von Schicht V Neuronen (Fu und Zuo, 2011). Die hier vorgestellten Daten beschreiben nach aktuellem Stand der Literatur daher zum ersten Mal dendritische Spines basaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen mit der *in vivo* Mikroskopie. Unter Kontrollbedingungen ist die Spine-Dichte an den basalen Dendriten der Schicht II/III Neurone höher. Hinsichtlich der Dynamik dendritischer Spines wurde ein geringerer Anteil an entstehenden und verloren gegangenen Spines festgestellt, verglichen mit den sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen. Beide Dendriten-Populationen wurden, zumindest bezüglich aller hier untersuchten Parameter, durch das *Enriched Environment* in ähnlicher Weise beeinflusst.

In einem Vergleich der beiden experimentellen Ansätze, dem „*Enriched Environment* seit der Geburt“ und dem akuten *Enrichment*, wird deutlich, dass das Ausmaß des Effekts beim letzteren geringer ausfällt. Das hohe Level der Spine-Dichte bei den Mäusen, die seit ihrer Geburt im *Enriched Environment* lebten, wurde nach einem akuten *Enrichment* nicht erreicht. Das neuronale Netz der adulten Mäuse scheint sich bei gleicher Stimulation nicht auf einen Stand bringen zu lassen, den ein lebenslanges *Environmental Enrichment* bewirkt. Ausschlaggebend dafür könnte vor allem die Stimulation während der postnatalen Phase sein, da das neuronale Netz in diesem Zeitraum die höchste Plastizität aufweist (Hubel und Wiesel, 1970; Katz und Shatz, 1996). Dennoch ließ sich im somatosensorischen Kortex von adulten Tieren nach akutem *Enriched Environment* ein substantieller struktureller Umbau beobachten. Es kam zur Bildung neuer dendritischer Spines, von denen ein Großteil stabilisiert wurde. Andererseits gingen etablierte Spines verloren. Sicherlich wäre es in diesem Zusammenhang interessant, weitere Altersgruppen, sowohl jüngere als auch ältere, unter akuten Stimulationsbedingungen zu untersuchen, um die strukturelle Plastizität direkt mit dem Alter zu korrelieren.

Wesentlich ist die Beobachtung, dass das neuronale Netzwerk auf die generalisierte Stimulation zuerst mit der Bildung neuer dendritischer Spines reagiert und erst später ein Verlust von Spines einsetzt. Ähnliches wurde in einer Studie beobachtet, in der die strukturelle Plastizität im

motorischen Kortex von Mäusen analysiert wurde, die spezifisch das Ergreifen einer Belohnung in einem bestimmten Versuchsaufbau erlernen mussten. Auch hier folgte auf eine schnelle Neubildung von Spines eine verzögerte Eliminierung bereits bestehender Spines mit übereinstimmendem zeitlichen Verlauf (Xu *et al.*, 2009). In der ebenfalls in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchung zur BACE1-Inhibition wurde umgekehrt erst der Verlust der Neubildung von Spines beobachtet, dem verzögert ein Rückgang des Anteils verloren gegangener Spines folgte. Möglicherweise liegt diesen Beobachtungen ein homöostatischer Mechanismus zu Grunde, der für eine Balance der Spine-Dichte sorgen könnte. Werden mehr dendritische Spines gebildet, kommt es auch zu einem vermehrten Verlust von Spines. Umgekehrt führt ein Rückgang der Bildung von Spines zu einem Rückgang der Spineeliminierung. In ähnlicher Weise stellt das sogenannte *synaptic scaling* eine Form von homöostatischer Plastizität dar, in der neuronale Aktivität die Anzahl synaptischer NMDA-Rezeptoren reguliert und damit die Erregbarkeit von Neuronen in kontrollierbaren Grenzen hält (Perez-Otano und Ehlers, 2005; Turrigiano *et al.*, 1998). In der Studie von Xu *et al.*, 2009 wirkte der zeitlich versetzte Verlust von Spines der Entstehung neuer Spines entgegen und führte letztlich zu einer unveränderten Spine-Dichte. Dagegen resultiert die breite sensorische Stimulation des *Enriched Environments* in einem Nettogewinn an dendritischen Spines und könnte damit eine zusätzliche Ebene der strukturellen Veränderung darstellen.

Ob und in welchem Maß die strukturellen Veränderungen, die durch das *Enriched Environment* im neuronalen Netz induziert wurden, konkrete Erfahrungen widerspiegeln, soll im Folgenden diskutiert werden. Eine Reihe von Beobachtungen spricht diesbezüglich eher für einen generellen und weniger spezifischen Einfluss. So führte ein *Enriched Environment* beim Gehirn von Nagetieren zu Veränderungen auf ganz unterschiedlichen Ebenen. Das Gewicht des Gehirns wird erhöht, es kommt zu einer vermehrten Gliogenese als auch einer wesentlich gesteigerten hippocampalen Neurogenese, und die Ausbildung von neuen Synapsen wird induziert (Bennett *et al.*, 1969; Kempermann *et al.*, 1997; Kolb und Gibb, 1991; Soffie *et al.*, 1999). Eine Anreicherung neurotropher Faktoren wie BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*) und NT-3 (*neurotrophin-3*) wurde nach Stimulation durch ein *Enriched Environment* im Kortex und im Hippocampus, aber beispielsweise auch im Kleinhirn gemessen (Ickes *et al.*, 2000). In dieser Argumentationslinie eines grundsätzlichen Einflusses des *Enriched Environments* auf das neuronale Netz lassen sich auch Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Daten einordnen. Zum einen wirkte sich das *Enriched Environment* auf die sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen und die basalen Dendriten der Schicht II/III Neurone für alle untersuchten Parameter in ähnlicher Weise aus. Außerdem wurden innerhalb der Dendritenpopulationen die Veränderungen für die neu entstandenen und die verloren gegangenen Spines gleichmäßig verteilt an den analysierten Dendriten gefunden. Das heißt, es zeichnen sich keine Cluster von Dendriten ab, die besonders starke Veränderungen aufweisen, oder bei denen vorrangig neu gebildete beziehungsweise vorrangig verloren gegangene Spines zu finden sind.

Auf der anderen Seite lassen sich auch Parallelen zu Studien ausmachen, die den Einfluss spezifischer Lernerfahrungen auf die strukturelle Plastizität untersuchten, und die damit für gezielte

Veränderungen innerhalb des neuronalen Netzes sprechen. In der oben beschriebenen Greif-Aufgabe und in einem weiteren Test, bei dem Mäuse das Balancieren auf einem rotierenden Zylinder (Rotarod) lernen mussten, wurden neu gebildeten Spines über einen Zeitraum von bis zu 18 Monaten stabilisiert (Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Durch zusätzliches Training wurden spezifisch diese Spines gefestigt und das Ausmaß der Neubildung von Spines stellte einen Indikator für den resultierenden Lernerfolg dar (Xu *et al.*, 2009). Zusammen unterstreichen diese Befunde, dass dendritische Spines als physische Korrelate von Lernerfahrungen verstanden werden können. Analog dazu integrierte in der vorliegenden Studie ein Teil der neu entstanden Spines nach Stimulation durch das *Enriched Environment* dauerhaft in das neuronale Netz. Gleichzeitig gingen nach Induktion durch das *Environmental Enrichment*, wie auch in den Studien mit den definierten Lernaufgaben, dendritische Spines verloren, die ursprünglich fest in das neuronale Netz integriert waren (Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

Hypothetisch vorstellbar ist daher eine Kombination aus beidem; einerseits generellen Aspekten und andererseits spezifischen Veränderungen dendritischer Spines als Folge einer generalisierten Stimulation durch das *Enriched Environment*. Interessanterweise war die Dichte beider Spine-Klassen, der funktionell integrierten persistenten Spines und der kurzlebigen transienten Spines unter *Enriched Environment*-Bedingungen signifikant erhöht. Es lässt sich spekulieren, dass diese Spine-Klassen die beiden unterschiedlichen Aspekte der Veränderungen abbilden. Die verbesserten kognitiven Fähigkeiten, die bei *Enriched*-Tieren beobachtet wurden (Lee *et al.*, 2003; Rosenzweig, 1966; Schrijver *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2001), könnten daher aus folgendem resultieren: (1) Die gesteigerte Anzahl an etablierten Spines könnte dem neuronalen Netzwerk einen spezifischen und höheren Grad an Konnektivität verleihen. (2) Eine erhöhte Flexibilität könnte das Netzwerk durch die vermehrte Anzahl transienter Spines erreichen, die bei Bedarf in funktionelle Spines transformiert werden könnten.

Per definitionem setzt sich das *Enriched Environment* aus verschiedenen leblosen und sozialen Faktoren zusammen, und die Interaktion dieser Faktoren trägt wesentlich zur Komplexität dieses Versuchsmodells bei (van Praag *et al.*, 2000). Beispielsweise lernten Ratten, die in einem *Enriched*-Käfig gehalten wurden, besser als Ratten, die lediglich die Möglichkeit zu ausgiebiger freiwilliger Bewegung hatten (Bernstein, 1973). Den Einfluss aller Einzelelemente des *Enriched Environments* auf die strukturelle Plastizität im somatosensorischen Kortex zu überprüfen, wäre allerdings sehr aufwendig. Eine Möglichkeit, um spezifische Lernerfahrungen zu beobachten, wäre der sogenannte *roughness discrimination*-Test. Bei diesem Test lernen die Mäuse, mithilfe ihrer Vibrissen verschieden raue Oberflächen voneinander zu unterscheiden (Cybulska-Klosowicz und Kossut, 2001).

Der hier etablierte Kombination aus *Enriched Environment* und *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie stellt eine Möglichkeit dar, lernabhängige Mechanismen auf der Ebene der strukturellen Plastizität zu untersuchen. Um die synaptische Funktion einzelner Proteine aufzuklären, könnte so überprüft werden, ob sich der Verlust oder die Überexpression dieser Proteine in entsprechenden Mausmodellen auf die induzierte strukturelle Plastizität auswirkt. Analog ließe sich auch

analysieren, ob beispielsweise Mausmodelle der Alzheimerschen Erkrankung in der Lage sind, auf die Stimulation des *Enriched Environments* zu reagieren. Ein Verlust der synaptischen Plastizität konnte in solchen Mausmodellen kürzlich anhand der neuronalen Aktivität kortikaler Nervenzellen nach visueller Stimulation nachgewiesen werden (William *et al.*, 2012). Die vorgestellten Ergebnisse eröffnen damit eine Vielzahl interessanter zukünftiger Anwendungen.

Abschließend soll im Zusammenhang mit dem *Enriched Environment* ein Aspekt diskutiert werden, der von Wurbel, 2001 aufgegriffen wurde (Wurbel, 2001). Ein *Enriched Environment* unterscheidet sich von einem Standard- oder Kontrollkäfig dadurch, dass es erhöhte sensorische, soziale und motorische Stimulation bietet (van Praag *et al.*, 2000). Tatsächlich entsprechen diese Bedingungen der natürlichen Lebensweise der Mäuse beziehungsweise Ratten und eine Haltung im Standardkäfig stellt demnach eine artifizielle Reizverminderung dar. So entwickeln Nager in Standardkäfigen unnatürliche, stereotype Verhaltensweisen (Wurbel, 2001), was einen grundsätzlichen Einfluss auf das Nervensystem der Tiere nahelegt. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass das Modellsystem Maus mit der Haltung in einem Standardkäfig um einen zusätzlichen „Modell-Aspekt“ erweitert wird, der sich auf den jeweiligen Untersuchungsgegenstand auswirken kann.

5.2 Viraler Gentransfer für die *in vivo* Mikroskopie

Um das Anwendungsspektrum der *in vivo* Mikroskopie zu erweitern, sollte in dieser Arbeit der Einsatz lentiviraler Partikel etabliert werden. Es wurden lentivirale Vektoren generiert, die mithilfe eines CaMKII(1,3kb)-Promotorfragments eine neuronenspezifische Expression von GFP gewährleisten sollten. Die kortikale Injektion dieser Viruspartikel führte zu einer Fluoreszenzmarkierung von Schicht V und Schicht II/III Neuronen, die auch die Aufnahme dieser Neurone, deren Dendriten und einzelner dendritischer Spines mit der intravitralen Zwei-Photonen-Mikroskopie ermöglichte. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den publizierten Daten von Dittgen *et al.*, 2004, die die Grundlage für die hier vorgestellten Experimente bildeten. Zusätzlich wurde beobachtet, dass kontralateral projizierende Axone der transduzierten Neurone markiert waren, die ebenfalls *in vivo* mikroskopiert werden konnten. Obwohl grundsätzlich möglich, war die Markierung dendritischer Spines durch den lentiviralen Vektor nicht optimal. Im zentralen Bereich der Injektion waren Neurone und Dendritenbäume so dicht gefärbt, dass separierte Dendritenabschnitte mit den Spines nicht aufgelöst werden konnten. An der Peripherie der Injektion war dies in einzelnen Fällen möglich. Eine Verminderung der Viruskonzentration führte zwar zu einer weniger dichten Markierung. Allerdings war das Signal der einzelnen Neurone schlechter, was dafür spricht, dass eine Zelle von mehreren Viruspartikeln transduziert werden muss, um optimale Mengen an GFP zu exprimieren. Möglicherweise könnte dieser Ansatz daher mit einem stärkeren Promotor verbessert werden. Auch in anderen Laboren hat sich die virale Fluoreszenzmarkierung von Neuronen zur chronischen Zwei-Photonen-Mikroskopie von dendritischen Spines gegenüber den XFP-Mäusen nicht durchsetzen können, da sie bisher erst in zwei Studien Anwendung fand (Lendvai *et al.*, 2000; Spires *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite bietet die Verwendung lentiviraler

Vektoren die Möglichkeit, neben einem Fluorophor zusätzliche genetische Informationen zur Manipulation der transduzierten Zellen einzubringen.

5.3 Die strukturelle Plastizität axonaler Boutons

Mithilfe der lentiviral-vermittelten Expression von GFP in kontralateral projizierenden Axonen von Schicht II/III Neuronen konnten *in vivo* einzelne axonale Boutons mikroskopiert und über einen Zeitraum von Wochen verfolgt werden. Für die Aufnahmen musste mit höherer Laserleistung angeregt werden, um die Fluoreszenz der feinen axonalen Strukturen zu detektieren. Dies führte zu einem vermehrten Auftreten von phototoxischen Effekten. Mit einer höheren Expression der Fluorophore oder mit dem Einsatz von empfindlicheren Detektoren, wie den neuerdings verwendeten GaAsP- (Galliumarsenidphosphid-) Detektoren, könnte dieser Ansatz praktikabel werden. Der Großteil der axonalen Boutons war stabil über den Beobachtungszeitraum. Allerdings waren auch der Verlust und die Neubildung von Boutons zu beobachten. Eine analoge Dynamik und eine ähnliche Dichte der Boutons konnte an ipsilateralen Axonen kortikaler Neurone in GFP-M-Mäusen gemessen werden (De Paola *et al.*, 2006). Die ultrastrukturelle Analyse von neu entstanden Boutons zeigte, dass diese tatsächlich Synapsen mit dendritischen Spines ausbilden (De Paola *et al.*, 2006). Das Auftreten neu gebildeter und verloren gegangener axonaler Boutons konnte unter Verwendung viraler Fluoreszenzmarkierung in einer weiteren *in vivo* mikroskopischen Studie in Primaten, genauer im visuellen Kortex von Makaken, bestätigt werden (Stettler *et al.*, 2006; Yamahachi *et al.*, 2009)).

Ebenfalls im Kortex von Makaken wurde gezeigt, dass sensorische Reize die Dynamik axonaler Boutons beeinflussen. Nach einer akuten Retina-Läsion wurden neben dem Umbau der axonalen Verzweigungen auch ein schnelles Entstehen neuer Boutons und ein verzögerter Verlust von Boutons beobachtet (Yamahachi *et al.*, 2009). Im murinen Kortex führten sowohl Retina-Läsionen als auch das Stutzen der Vibrissen zu einer Zunahme der Bouton-Dichte an Axonen excitatorischer Neurone, beziehungsweise zu einem gesteigerten Verlust von Boutons inhibitorischer Neurone (Keck *et al.*, 2011; Marik *et al.*, 2010). Mit den vorgestellten vorläufigen Daten zu strukturellen Veränderungen der axonalen Boutons als Reaktion auf das *Enriched Environment* konnte hier gezeigt werden, dass auch eine physiologische Stimulation zu einem Umbau an Axonen führte, die im vorliegenden Fall in einer Zunahme an Boutons resultierte. Es sei noch einmal erinnert, dass die hier gezeigten Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Axone nicht repräsentativ sind. Zusammenfassend ist die neuronale Verarbeitung sensorischer Informationen mit strukturellen Veränderungen auf der prä- und auf der postsynaptischen Seite mit einer ähnlichen Kinetik verbunden.

5.4 APP und dendritische Spines

Der Einfluss von APP auf dendritischen Spines wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Bei 12 Monate alten APP-*knockout* Mäusen wurde im Hippocampus und an apikalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen eine verminderte Spine-Dichte gemessen (Lee *et al.*, 2010a). Zumindest auf der Ebene der Präsynapsen konnten zwei weitere Arbeiten bei APP-*knockout* Tiere keinen Unterschied zu Wildtyp-Kontrollen feststellen (Phinney *et al.*, 1999; Seabrook *et al.*, 1999). Demgegenüber resultierte der Verlust von APP in einer Studie aus unserem Labor in der Verdoppelung der Dichte dendritischer Spines (Bittner *et al.*, 2009). Für Mäuse, die heterozygot *knockout* waren, lag die Spine-Dichte zwischen den Kontrollen und den *knockout* Tieren, was für einen dosisabhängigen Effekt der APP-Expression spricht (Bittner *et al.*, 2009). Das Ergebnis wurde durch den Befund gestützt, dass kultivierte hippocampale Neurone von APP-*knockout* Mäusen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an präsynaptischen Endigungen hatten (Priller *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Spine-Dichte in jungen APP-*knockout* Tieren *in vivo* gemessen. Im Alter von 16 Tagen ist das neuronale Netzwerk des somatosensorischen Kortex noch in seiner Entwicklung und die apikalen Dendriten weisen eine erhöhte Dichte an Spines auf. Diese fällt im Laufe der folgenden zwei bis drei Wochen graduell auf einen konstanten Wert ab (Holtmaat *et al.*, 2005). Interessanterweise ist die Expression von APP, aber auch die der APP-prozessierenden Proteine BACE1 und Präsenilin1 in den ersten Wochen der postnatalen Entwicklung erhöht (Löffler und Huber, 1992; Ribaut-Barassin *et al.*, 2003; Willem *et al.*, 2006). Um die Zunahme der Spine-Dichte bei adulten APP-*knockout* Mäusen zu erklären, sind im Wesentlichen zwei mögliche Hypothesen denkbar: (1) APP könnte wichtig für die entwicklungsbedingten Reduktion von Spines sein, die in den *knockout* Tieren dann nicht zu beobachten wäre. (2) APP könnte in die vorgelagerte Spinogenese involviert sein. Ein Verlust des Proteins würde in diesem Fall zu einer noch höheren Spine-Dichte an Tag 16 führen, die dann auf den Wert der adulten Tiere abfällt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Spine-Dichte apikaler Dendriten im somatosensorischen Kortex sowohl in den heterozygoten als auch in den vollständigen APP-*knockout* Mäusen im Alter von 16 Tagen von den Wildtyp-Kontrollen nicht zu unterscheiden ist. Allerdings wurde in allen Versuchsgruppen der entwicklungsbedingte Rückgang der Spine-Dichte beobachtet, auch wenn dieser bei den APP-*knockouts* tendenziell etwas schwächer war. Die hier vorgestellten Ergebnisse der jungen Tiere stehen daher im Konflikt zu den Befunden, die bei den adulten APP-*knockout* Mäusen erhoben wurden. Alternativ wäre denkbar, dass der APP-Verlust zu funktionellen Veränderungen an individuellen Spines führt und dadurch kompensatorische Mechanismen aktiviert, die zu einem späteren Zeitpunkt in der erhöhten Spine-Dichte resultieren. So wurde zum Beispiel gefunden, dass APP mit NMDA-Rezeptoren interagiert und deren Funktion beeinflusst (Hoe *et al.*, 2009). Auch im Zusammenhang mit der Zelloberflächenrepräsentation von AMPA-Rezeptoren und deren Zusammensetzung wurde APP diskutiert (Lee *et al.*, 2010a). Diese Überlegungen sind allerdings spekulativ und legen die Notwendigkeit nahe, in einer einheitlichen Studie den Spine-Status in APP-*knockout* Mäusen von der frühen postnatalen Phase bis zur adulten Phase zu verfolgen.

Noch schwieriger wird der Versuch, die Rolle von APP an dendritischen Spines zu verstehen, zieht man die Studien an APP-überexprimierenden Mausmodellen mit in Betracht. In einer Vielzahl von Untersuchungen mit Mäusen, die Wildtyp-APP oder FAD-mutiertes APP exprimierten, konnten in unterschiedlichen Gehirnregionen und in unterschiedlichen Altersgruppen widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Spine-Dichte beobachtet werden (Jung und Herms, 2012). In der Summe der Studien zeichnete sich ab, dass in jüngeren APP-transgenen Mäusen tendenziell eine erhöhte oder eine unveränderte Spine-Dichte festgestellt wurde, während es in älteren Tieren mehrheitlich zu einem Verlust von Spines kam. Dies deutet darauf hin, dass in den älteren Mäusen möglicherweise ein synaptotoxischer Effekt des akkumulierenden A β -Peptids zum Tragen kommt (Hsieh *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010). In jungen Mäusen könnte dagegen der physiologische Einfluss von APP oder dessen Spaltprodukte überwiegen. In jedem Fall wird deutlich, dass APP eine wesentliche und wahrscheinlich vielschichtige Rolle bei der Bildung und dem Erhalt dendritischer Spines spielt. Um diese Rolle genauer *in vivo* zu charakterisieren, müssten zukünftige Studien einheitlicher und vergleichbarer hinsichtlich der verwendeten Technik, des Modells, des Alters und der untersuchten Gehirnregion gestaltet werden. Des Weiteren müsste versucht werden, den Einfluss des APP-Holoproteins und der verschiedenen Spaltprodukte isoliert zu analysieren.

Die Operation des kranialen Fensters und die sich anschließende *in vivo* Mikroskopie von jungen Mäusen konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden. Die hier erhobenen Werte für die Spine-Dichte und den entwicklungsbedingten Spine-Rückgang entsprechen den publizierten Daten (Holtmaat *et al.*, 2005). Im Vergleich zur Operation an adulten Mäusen erfordert die Operationen an jungen Tieren eine vermehrte Vorsicht bei der Narkose und beim Bohren des weichen Knochens. Nicht alle jungen Mäuse wurden nach der Operation von der jeweiligen Mutter akzeptiert. Außerdem war der Anteil der mikroskopierbaren kranialen Fenster vermindert. Trotz des Mehraufwandes lassen sich auf diese Weise jedoch wichtige Informationen zur entwicklungsbedingten Plastizität gewinnen. Interessant wäre zum Beispiel, wie sich ein *Enriched Environment* auf die dendritischen Spines im sich entwickelnden neuronalen Netz auswirkt.

5.5 Präsenilin1 und dendritische Spines

Neuere Studien legen eine physiologische Funktion von Präsenilinen bei der synaptischen Übertragung nahe und Präsenilin-Mutationen, die mit der Alzheimerschen Erkrankung assoziiert sind, scheinen diese Funktion zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression von FAD-mutiertem PS1, aber auch von humanem Wildtyp-PS1 zu einer erhöhten Dichte dendritischer Spines von kortikalen Neuronen führte. Dieser Effekt war unabhängig von der γ -Sekretase-Aktivität, da die Prozessierung von Substraten, die theoretisch für die veränderte strukturelle Plastizität verantwortlich sein könnten, nicht beeinflusst wurde. Dagegen deutete eine erhöhte Expression des Ryanoidin-Rezeptors auf eine veränderte Ca²⁺-Homöostase hin.

Die Beobachtung einer erhöhten Spine-Dichte in Mausmodellen der Alzheimerschen Erkrankung war unerwartet, da im Gehirn von Alzheimer Patienten die Anzahl an Synapsen vermindert ist (DeKosky und Scheff, 1990; Terry *et al.*, 1991). Allerdings wurden verbesserte synaptische Eigenschaften in einer Reihe von Studien für PS1-transgene Mäuse beschrieben. So wurde übereinstimmend in zahlreichen elektrophysiologischen Untersuchungen von verschiedenen FAD-PS1 überexprimierenden Mauslinien, einschließlich der hier verwendeten Linie mit der A246E Mutation, als auch in *knockin*-Modellen ein signifikant erhöhtes LTP an hippocampalen Synapsen gemessen (Auffret *et al.*, 2010; Auffret *et al.*, 2009; Barrow *et al.*, 2000; Dewachter *et al.*, 2008; Parent *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009a; Zaman *et al.*, 2000). In Verhaltensversuchen zeigten FAD-PS1 transgene Mäuse in Abhängigkeit vom Test und von der verwendeten Mauslinie entweder Verbesserungen, Verschlechterungen oder kein verändertes Lernen. Beispielsweise waren A246E-PS1 Tiere unauffällig bei einem Test, in dem ein neues Objekt als unbekannt identifiziert werden sollte (*novel recognition*), während sie in der kontextabhängigen Angstkonditionierung (*contextual fear conditioning*) ein verbessertes Lernen zeigten (Dewachter *et al.*, 2008). Die Dichte dendritischer Spines als direktes Maß der Synapsenanzahl in FAD-PS1 Mäusen wurde bisher erst in einer einzigen Studie untersucht. In einem Alter von vier bis fünf Monaten zeigten L286V-PS1 Mäuse eine erhöhte Spine-Dichte an Golgi-Cox-gefärbten Pyramidenzellen der hippocampalen CA1-Region (Auffret *et al.*, 2009), analog zu dem Effekt, der hier für kortikale Neurone von Mäusen der Linie A246E-PS1 mit sechs bis acht Monaten beschrieben wurde. Während in den meisten Publikationen nur junge PS1-Mäuse untersucht wurden, schlossen die zwei Studien von Auffret *et al.* auch alte Tiere ein. Dort konnte gezeigt werden, dass das erhöhte hippocampale LTP in jungen L286V-PS1 und in M146V-PS1-*knockin* Mäusen mit zunehmendem Alter abnahm und bei Tieren im Alter von 12-14 Monaten signifikant unter dem Wert der Kontrollen lag (Auffret *et al.*, 2010; Auffret *et al.*, 2009). Analog dazu ging auch die Spine-Dichte im Hippocampus acht bis zehn Monate alter L286V-PS1 Mäuse zurück (Auffret *et al.*, 2009). Interessant wäre daher die altersabhängige Untersuchung der dendritischen Spines von kortikalen Neuronen der in dieser Arbeit verwendeten FAD-PS1 Linie. In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Daten konnte hinsichtlich der Form der Spines von Auffret *et al.* in den FAD-PS1 überexprimierenden Mäusen ebenfalls keine Veränderung der Spine-Klassen-Verteilung festgestellt werden (Auffret *et al.*, 2009). Auch in einer ultrastrukturelle Analyse der Länge dendritischer Spines wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp- und FAD-PS1-Mäusen beobachtet (Dewachter *et al.*, 2008).

In Mäusen, die humanes Wildtyp-PS1 überexprimierten, wurde eine erhöhte Spine-Dichte spezifisch in den sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen gefunden. Dagegen war die Spine-Dichte der basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen vergleichbar mit den Wildtyp-Kontrollen. Für hippocampale Neurone war die Spine-Dichte der hPS1-Mäuse bei Auffret *et al.* ebenfalls auf dem Niveau der Kontrollen, allerdings wurden bei den LTP-Messungen signifikante Effekte bei diesen Mäusen festgestellt (Auffret *et al.*, 2009). Ähnlich orientierten sich die Werte der hPS1 Tiere in verschiedenen elektrophysiologischen und Verhaltens-Experimenten zwischen den Werten der Kontrollen und der FAD-PS1-Gruppe, ohne dass die Unterschiede dabei

signifikant waren (Barrow *et al.*, 2000; Dewachter *et al.*, 2008; Parent *et al.*, 1999; Priller *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2001; Zaman *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde in den meisten dieser Publikationen bei einzelnen Experimenten die hPS1-Versuchsgruppe berücksichtigt, in anderen aber nicht (Dewachter *et al.*, 2008; Priller *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2001; Zaman *et al.*, 2000). In einer Arbeit wurden hPS1-Mäuse und Wildtyp Tiere sogar alternierend als Kontrollgruppe herangezogen (Barrow *et al.*, 2000). Zusammenfassend verdeutlichen diese Studien, dass auch überexprimiertes hPS1 einen Einfluss auf synaptische Parameter hat. Für zukünftige Untersuchungen an überexprimierendem FAD-PS1-Modellen sollten daher beide Kontrollgruppen, die nichttransgenen und die hPS1-transgenen Tiere, mitgeführt werden. Bisher sind Langzeiteffekte von überexprimiertem hPS1 wenig untersucht worden (Auffret *et al.*, 2009). Allerdings deuten Befunde auf eine kritische Rolle des Expressionsniveaus von humanem Wildtyp-PS1 beim physiologischen Altern und bei der Neurodegeneration hin (Kumar *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2008).

Es ist weitestgehend akzeptiert, dass bei familiären Formen der Alzheimerschen Erkrankung Mutationen in den Präsenilinen zu einer relativen Erhöhung des A β 42-Peptids gegenüber dem A β 40 führen (Borchelt *et al.*, 1996; Duff *et al.*, 1996; Murayama *et al.*, 1999; Scheuner *et al.*, 1996), welche die Aggregation und die Neurotoxizität des A β -Peptids bewirkt (McGowan *et al.*, 2005). Allerdings häufen sich Belege, die die Absolutheit dieser Aussage in Frage stellen (Batelli *et al.*, 2008; Bentahir *et al.*, 2006; Heilig *et al.*, 2010; Shioi *et al.*, 2007). Beispielsweise konnte eine Mutation im PS1 von Patienten mit einer früh einsetzenden familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung identifiziert werden, die beinahe zu einem vollständigen Verlust der γ -Sekretase-Aktivität führt (Heilig *et al.*, 2010). Bentahir *et al.*, 2006 fanden in Zellen, die die A246E-mutierte PS1-Variante exprimierten, keine Veränderungen der APP-Prozessierung im Vergleich zu Wildtyp-PS1. Entsprechendes galt auch für die proteolytische Spaltung von Notch und N-Cadherin (Bentahir *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die A246E-Mutation auch im Mausmodell die Prozessierung von endogenem APP und N-Cadherin nicht beeinflusst. Als weiteres Kandidatensubstrat wurde der Ephrinrezeptor EphA4 untersucht, für den ein γ -Sekretase-abhängiger Effekt auf die Dichte dendritischer Spines bereits beschrieben worden war (Inoue *et al.*, 2009). Auch für Prozessierung von EphA4 konnte mittels Westernblotanalysen, die sowohl von Gehirnhomogenaten als auch von Synaptosomenpräparationen durchgeführt wurden, kein Unterschied zwischen FAD-PS1, Wildtyp-PS1 und nichttransgenen Kontrollen festgestellt werden. Obwohl ein möglicher Effekt auf die Prozessierung anderer Substrate nicht ausgeschlossen werden kann, lassen die Ergebnisse der hier getesteten Kandidatenproteine auf eine γ -Sekretase-unabhängige Ursache für den beobachteten Spine-Phänotyp in den PS1-transgenen Mäusen schließen.

Neben der zentralen Rolle innerhalb des γ -Sekretase-Komplexes sind weitere zelluläre Funktionen der Präseniline beschrieben. Die neuropathologischen Auswirkungen von Präsenilin-Mutationen auf diese Funktionen werden intensiv diskutiert (Pimplikar *et al.*, 2010). Eine Schlüsselfunktion hat PS1 bei der Regulation der Ca²⁺-Homöostase von Neuronen. Für FAD-PS1-Mutationen wurde gezeigt, dass die physiologische Ca²⁺-Signalfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum

beeinträchtigt war (LaFerla, 2002). Es wurden verschiedene molekulare Mechanismen vorgeschlagen, wie PS1 den zellulären Ca^{2+} -Haushalt beeinflussen kann. Danach macht PS1 selbst die Membran des Endoplasmatischen Retikulums Ca^{2+} -durchlässig (Tu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010), moduliert die Öffnungswahrscheinlichkeit von Inositol-3-Phosphat Rezeptoren (Cheung *et al.*, 2010; Cheung *et al.*, 2008) oder erhöht die Expression der Ryanoidin-Rezeptoren (Chakroborty *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2005; Stutzmann *et al.*, 2006). Ryanoidin-Rezeptor-abhängige Ca^{2+} -Effekte waren besonders ausgeprägt in den Dendriten und den dendritischen Spines von FAD-PS1-transgenen Mäusen (Goussakov *et al.*, 2010). Ohne weiter auf den Mechanismus einzugehen, wurde in der vorliegende Studie das Expressionsniveau des Ryanoidin-Rezeptors als Indikator für eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase betrachtet, welche für die A246E-PS1-Tiere bestätigt werden konnte. Interessanterweise war die Überexpression von humanem Wildtyp-PS1 ausreichend für ein erhöhtes Ryanoidin-Rezeptor-Level, welches allerdings niedriger als das FAD-PS1 Niveau war. Unter Berücksichtigung der zentralen Rolle von Ca^{2+} als Botenstoff bei der synaptischen Plastizität könnten die PS1-abhängigen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase für die erhöhten Spine-Dichten verantwortlich sein, die bei den PS1-transgenen Mäusen beobachtet wurden. Eine mögliche Erklärung, warum die Expression von hPS1 nur die Spine-Dichte der sich verzweigenden apikalen Dendriten der Schicht V Neurone, nicht aber die basalen Dendriten der Schicht II/III Neurone beeinflusst, ist in der räumlichen Heterogenität der Ca^{2+} -Verteilung zu sehen. Die beiden Typen kortikaler Pyramidenzellen unterscheiden sich in der Art ihrer Ca^{2+} -Antwort auf ein Aktionspotential (Helmchen *et al.*, 1999). Des weiteren ist die Expression des Ca^{2+} -puffernden Proteins Calbindin-D28k in Schicht II/III Neuronen ausgeprägter als in Schicht II/III Neuronen (van Brederode *et al.*, 1991). Alternativ könnten auch Unterschiede zwischen dem apikalen und dem basalen dendritischen Kompartiment zum Tragen kommen. So kann der Ca^{2+} -Haushalt innerhalb einer Zelle regional spezifisch reguliert werden, beispielsweise durch eine unterschiedliche Expression von Ca^{2+} -Pumpen (Holthoff *et al.*, 2002; Schmidt und Ehrlich, 2010). Entsprechend der moderaten Erhöhung der Expressionslevel des Ryanoidin-Rezeptors könnte der Effekt auf die Ca^{2+} -Homöostase in den hPS1-Mäusen weniger stark sein als in den FAD-PS1-Tieren, was möglicherweise von den basalen Dendriten aber nicht von den apikalen Dendriten kompensiert werden kann. Leider lassen sich die apikalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen nicht adäquat mikroskopieren und analysieren, was gegebenenfalls zur Klärung dieses Punktes beitragen könnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von FAD-PS1, aber auch die Überexpression der humanen Wildtyp-Variante die strukturelle Plastizität dendritischer Spines an kortikalen Neuronen von Mäusen beeinflusst und dass diese Effekte wahrscheinlich die Folge eines veränderten Ca^{2+} -Haushaltes sind. Eine Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase wird im Kontext der Alzheimer-Pathologie auf verschiedenen Ebenen diskutiert (LaFerla, 2002). So wurde zum Beispiel eine erhöhte Expression des Ryanoidin-Rezeptors bei Patienten der Alzheimerschen Erkrankung beobachtet (Kelliher *et al.*, 1999). Allerdings scheinen die Effekte auf intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher spezifisch für FAD- PS1 zu sein, da sich FAD-Mutationen im APP nicht direkt auf die Ca^{2+} -Homöostase auswirken (Stieren *et al.*, 2010). Offen bleibt die Frage, inwieweit die physiologischen Funktionen des PS1 bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts und bei der strukturellen

Plastizität dendritischer Spines im Zusammenhang mit der Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung stehen. Die Ergebnisse machen auch deutlich, dass Daten von transgenen Modellen der Alzheimerschen Erkrankung, wie den häufig verwendeten APP-PS1 doppeltransgenen Mäusen, kritisch hinterfragt werden müssen, da die einzelnen Transgene vielschichtige und komplexe Auswirkungen auf den zu untersuchenden Phänotyp haben können. So sind beispielsweise die synaptische Plastizität und die Anzahl von Synapsen typische Zielgrößen bei der Analyse solcher Alzheimer-Modelle.

5.6 BACE1 und dendritische Spines

Im somatosensorischen Kortex von sechs Monate alten BACE1-*knockout* Mäusen konnte weder eine Veränderung der Spine-Dichte, noch eine veränderte Dynamik der Spines an den sich verzweigenden apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen und an den basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen beobachtet werden. Dieser Befund ist überraschend, da in einer anderen Studie im Hippocampus dieser Mäuse eine verminderte Dichte dendritischer Spines beschrieben wurde (Savonenko *et al.*, 2008). In den hier verwendeten YFP-H Mäusen konnte der Effekt eines Verlustes von BACE1 im adulten Hippocampus auf die Spine-Dichte nicht überprüft werden, da die Fluoreszenzmarkierung so dicht war, dass einzelne Dendritenabschnitt nicht aufgelöst werden konnten (Abbildung 3).

Die Expression von BACE1 ist in den ersten beiden postnatalen Wochen sehr viel höher als im adulten Gehirn (Willem *et al.*, 2006). Ein Verlust des Proteins sollte sich daher am wahrscheinlichsten in diesem Zeitraum bemerkbar machen. In der hippocampalen CA1-Region 16 und 32 Tage alter BACE1-*knockout* Tiere konnte tatsächlich eine verminderte Spine-Dichte beobachtet werden, die sich aber mit zunehmendem Alter dem Wildtypwert annäherte. Auch an sich verzweigenden apikalen Dendriten kortikaler Neurone schien die Spine-Dichte in jungen Tieren kleiner zu sein, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Leider erlauben die Ergebnisse nur einen lückenhaften Einblick in die Entwicklung der Spine-Dichte in den BACE1-*knockout* Mäusen, da die Analyse an die Expression des YFP gebunden war. Tendenziell scheint vor allem in der Entwicklung, in der das neuronale Netz sehr plastisch ist, ein Verlust von BACE1 zu einer Reduktion dendritischer Spines zu führen. Diese könnte, zumindest teilweise, über kompensatorische Mechanismen zu späteren Zeitpunkten ausgeglichen werden. Da hier der 16 Tage Zeitpunkt für die kortikalen Neurone und die Quantifizierung der Spine-Dichte im adulten Hippocampus nicht untersucht werden konnten, ist diese Schlussfolgerung jedoch als vorläufig zu betrachten. Eine umfassende Analyse der Spine-Dichte von BACE1-*knockout* Mäusen während der Entwicklung, beispielsweise mit einer Golgi-Färbung, könnte diesbezüglich wesentliche Informationen liefern. Interessanterweise erscheinen die Spines in den jungen BACE1-*knockout* Tieren vermehrt elongiert und unreif. Daher könnte eine *in vivo* mikroskopische Studie analog zu den APP-*knockout* Mäusen einen Einblick in die Entwicklung der Spines im BACE1-*knockout* Gehirn liefern. Zusammen deuten die Ergebnisse auf eine Rolle von BACE1 bei der Ausbildung

synaptischer Kontakte, die vor allem im sehr plastischen neuronalen Netzwerk zum Tragen kommt. So könnte der Unterschied in der Spine-Dichte zwischen Hippocampus und somatosensorischem Kortex in *BACE1-knockout* Tieren im Vergleich zu Wildtypkontrollen darin liegen, dass der Hippocampus eine höhere Plastizität als der Kortex aufweist. Beispielsweise werden im *Gyrus dentatus* des Hippocampus auch in adulten Tieren neue Neurone gebildet und diese integrieren fortwährend in das neuronale Netzwerk (Altman und Das, 1965; van Praag *et al.*, 2002). Eine *in vivo* Langzeit-Untersuchung der Plastizität dendritischer Spines im Hippocampus wurde bisher allerdings noch nicht veröffentlicht.

Mit dem kompetenten BACE1-Inhibitor SCH-1682496 wurde der Einfluss eines akuten Verlustes der BACE1-Aktivität auf dendritische Spines im somatosensorischen Kortex überprüft. Eine 16-tägige Behandlung mit dem Inhibitor führte zu einer signifikanten Verminderung der Ausbildung neuer Spines, die letztlich auch in einer Senkung der Spine-Dichte resultierte. Diese Effekte waren reversibel und erreichten nach Beendigung der Behandlung wieder ihren Ausgangswert. Zusätzlich wurde beobachtet, dass dendritische Spines, die trotz BACE1-Inhibition gebildet wurden, weniger stabil waren und folglich weniger gut in das neuronale Netzwerk integriert werden konnten. Diese Befunde sind in zweierlei Hinsicht von wesentlicher Bedeutung. Einerseits stellen sie den therapeutischen Ansatz einer Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung durch Minderung der BACE1-Aktivität grundsätzlich in Frage. Andererseits geben sie einen wichtigen Einblick in die physiologische Funktion von BACE1 für dendritische Spines.

Die Ergebnisse der beiden Experimente, die Analyse des *BACE1-knockout* und die pharmakologische Inhibition von BACE1, stellen einen Widerspruch dar. Wie kann eine akute BACE1-Inhibition die Neubildung dendritischer Spines beeinflussen, wenn der genetische *knockout* von BACE1 keinen Effekt auf die Spines hat? Ein möglicher und hypothetischer Erklärungsansatz wäre, dass in den *knockout* Tieren der Verlust von BACE1 im adulten Gehirn durch alternative Mechanismen kompensiert wird, während sich dieser Verlust im sich entwickelnden Gehirn durchaus bemerkbar macht. Diesbezüglich sind auch verschiedene Folgeexperimente vorstellbar. Einerseits würde man in jungen Wildtyp-Mäusen einen noch stärkeren Effekt des BACE1-Inhibitors auf die Spines vermuten. Zum anderen könnte die Spezifität des Inhibitors in *BACE1-knockout* Tieren getestet werden, da man nach Inhibition keinen Effekt erwarten würde.

Da eine Vielzahl an BACE1-Substraten bekannt ist (Hemming *et al.*, 2009), wäre es für das Verständnis von dendritischen Spines von Bedeutung, das Substrat zu identifizieren, das für den beschriebenen Effekt verantwortlich ist. Wie bereits ausführlich diskutiert, scheint APP selbst eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Spines zu spielen (Jung und Herms, 2012) und das A β -Peptid ist in der Lage, die synaptische Übertragung zu modulieren (Kamenetz *et al.*, 2003). Um diesbezüglich einen Zusammenhang zu testen, könnte der Effekt des BACE1-Inhibitors in den *APP-knockout* Mäusen untersucht werden. Ein weiterer möglicher Kandidat ist das Substrat Neuregulin1 (NRG1). In *BACE1-knockout* Mäusen akkumulierte das ungeschnittene NRG1 und die Interaktion zwischen NRG1 und einem Komplex der Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB₂-ErbB₄ ist für die Ausbildung der Myelinscheide maßgebend (Hu *et al.*, 2006; Willem *et al.*, 2006). Konditionale

ErbB₂ und ErbB₄ doppel-*knockout* Mäuse zeigten eine reduzierte Spine-Dichte und ein erhöhtes NRG1-Level förderte die Maturierung dendritischer Spines in neuronaler Zellkultur (Barros *et al.*, 2009). Die Evaluierung möglicher Kandidatensubstrate für den beobachteten Spine-Effekt *in vivo* ist schwierig. Ließe sich jedoch in neuronaler Zellkultur die verminderte Spinebildung nach BACE1-Inhibition rekonstruieren, könnte durch eine anschließende Präsentation des rekombinant-hergestellten Kandidatenfragments im Kulturmedium der Inhibitions-Effekt wieder rückgängig gemacht werden. Auf diese Weise wäre es möglich, das verantwortliche Substrat zu identifizieren.

BACE1 eröffnet den amyloidogenen Prozessierungsweg des APP und ist damit für die Generierung des A β -Peptids geschwindigkeitsbestimmend. Daher stellt das Protein ein interessantes Zielmolekül für eine therapeutische Intervention beziehungsweise für einen prophylaktischen Ansatz bei der Alzheimerschen Erkrankung dar. Tatsächlich konnten Verkreuzungen von FAD-APP-transgenen Mäusen, die normalerweise eine starke A β -Pathologie aufweisen, auf einen BACE1-*knockout* Hintergrund sowohl die A β -Plaquelagerungen als auch die Lerndefizite vollständig aufheben (Laird *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2004). Die verminderte BACE1-Expression in heterozygoten BACE1-*knockout* Tieren, die zusätzlich transgen für FAD-APP waren, reichte aus, um die A β -Pathologie wesentlich zu senken (Laird *et al.*, 2005; McConlogue *et al.*, 2007). Entsprechend wurde in jüngster Zeit eine Reihe von Substanzen entwickelt, die BACE1 in Mäusen (Atwal *et al.*, 2011; Fukumoto *et al.*, 2010; Malamas *et al.*, 2010; Sankaranarayanan *et al.*, 2008) und sogar in Primaten (Sankaranarayanan *et al.*, 2009) inhibieren und die A β -Level senken. In der ersten Veröffentlichung einer klinischen Studie reduzierte die einmalige Gabe des BACE1-Inhibitors LY2811376 die A β ₄₀-Level in der cerebrospinalen Flüssigkeit um etwa 50% (May *et al.*, 2011). Trotz dieser Erfolge wurde vor zu hohen Erwartungen gewarnt, da mit der BACE1-Inhibition eben nicht nur in die A β -Generierung, sondern möglicherweise in eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse eingegriffen wird und potentielle Nebenwirkungen erst aufgeklärt werden müssen (De Strooper *et al.*, 2010; Vassar *et al.*, 2011). So musste der LY2811376-Ansatz auf Grund toxischer Nebenfunde, die in einem präklinischen Test beobachtet wurden und BACE1-unabhängig waren, aufgegeben werden (May *et al.*, 2011). Analog dazu musste der vielversprechende Ansatz mit dem γ -Sekretase Inhibitor Semagacestat von Eli Lilly nach einer klinischen Studie der Phase III gestoppt werden, da die behandelten Patienten eine stärkere Verschlechterung der kognitiven Leistungen als die Vergleichsgruppe zeigten (Schor, 2011). Im Mausmodell hatte eine mehrtägige Behandlung mit dieser Substanz einen irreversiblen Verlust dendritischer Spines zur Folge, was mithilfe der *in vivo* Mikroskopie aufgedeckt werden konnte (Bittner *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde nun zum ersten Mal gezeigt, dass auch eine Inhibition von BACE1 zu einem kritischen Nebeneffekt auf der Ebene der dendritischen Spines, nämlich zu einer reversiblen Verminderung und Destabilisierung neu gebildeter Spines führt. Ob der beschriebene Effekt spezifisch für die Inhibition von BACE1 ist, müsste in einem zusätzlichen Experiment kontrolliert werden. Eine Möglichkeit wäre, wie schon erwähnt, den Inhibitor in BACE1-*knockout* Mäusen zu testen. Alternativ könnte ein zusätzlicher Inhibitor eingesetzt werden, der den gleichen Effekt zeigen müsste. Als Negativkontrolle könnte eine Substanz mit ähnlicher chemischer Struktur dienen, die allerdings die β -Sekretase-Aktivität nicht beeinflusst.

Die Bedeutung von neu entstandenen Spines wurde bereits ausführlich diskutiert. Im murinen Gehirn bedingten spezifische Lerntests die Neubildung und die Stabilisierung von dendritischen Spines und der Lernerfolg korrelierte mit der Anzahl an neu entstandenen Spines (Xu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Eine Beeinträchtigung der Ausbildung neuer Spines, wie bei der Behandlung mit dem BACE1-Inhibitor beobachtet, könnte daher Lernen und Gedächtnis beeinflussen. Dies könnte analog zu den zitierten Studien in einem Verhaltensexperiment überprüft werden, bei dem unter BACE1-Inhibition das Erlernen einer spezifischen Aufgabe beobachtet wird und parallel dazu die Veränderungen an den dendritischen Spines mit der *in vivo* Mikroskopie verfolgt werden. Ein weiterer kritischer Aspekt ergibt sich aus dem Phänotyp der BACE1-*knockout* Mäuse. Obwohl auf den ersten Blick unauffällig (Luo *et al.*, 2001; Roberds *et al.*, 2001), führt der Verlust von BACE1 zu einer Reihe von neurologischen Dysfunktionen. BACE1-*knockout* Mäuse sind hyperaktiv, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für epileptische Anfälle und weisen verschiedene kognitive Störungen auf, die auf einen Schizophrenie-ähnlichen Phänotyp schließen lassen (Dominguez *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010; Laird *et al.*, 2005; Savonenko *et al.*, 2008). In Anbetracht dieser Befunde unterstützen die hier vorgestellten Daten die Bedenken zum therapeutischen Ansatz einer Verminderung der A β -Level durch Inhibition von BACE1 und verdeutlichen die Notwendigkeit einer genauen Evaluierung der Nebenwirkungen einer solchen Behandlung.

5.7 Generelle Aspekte der *in vivo* Mikroskopie dendritischer Spines

Die *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie zeichnet sich durch zwei wesentliche Vorteile gegenüber *ex vivo* Untersuchungen aus, die diese Methode zu einem essentiellen Werkzeug in den Biowissenschaften, vor allem in der Neurobiologie machen. (1) Zelluläre Strukturen, wie dendritische Spines, können in ihrer natürlichen Umgebung aufgenommen werden. Dies ist besonders für neuronale Strukturen von Bedeutung, die nur als integrierte Einheit im funktionierenden neuronalen Netzwerk ihre vollständigen physiologischen Eigenschaften aufweisen. (2) Die Strukturen können über einen langen Zeitraum verfolgt werden und mögliche Veränderungen nach physiologischer oder artifizieller Modifikation an ein und derselben Struktur beobachtet werden.

Auf der anderen Seite bringt die Methode auch verschiedene Limitationen mit sich. Unter umfangreichem technischem und zeitlichem Aufwand können oft nur begrenzte Datenmengen erhoben werden, da nicht zuletzt die Belastung der Versuchstiere möglichst gering sein muss. Hinsichtlich der Aufnahme von Dendriten und dendritischen Spines ist man auf die oberflächlichen Hirnregionen wie den oberen Schichten des Kortex begrenzt. Um das Spektrum an dendritischen Strukturen zu erweitern, wurde daher im Zuge dieser Arbeit das erste Mal die strukturelle Plastizität der basalen Dendriten von Schicht II/III Neuronen analysiert. Allerdings liegen Hirnregionen wie der Hippocampus, der sowohl im Bezug auf Lernen und Gedächtnis als auch hinsichtlich der Alzheimerschen Erkrankung von besonderem Interesse ist, zu tief, um direkt mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie erreichbar zu sein. In einzelnen Studien wurde daher Kortexmaterial

über dem Hippocampus entfernt, um mithilfe von Objektiven mit großem Arbeitsabstand oder Mikrolinsen (GRIN (*gradient refractive index*) Linsen) hippocampale Neurone zu mikroskopieren (Barretto *et al.*, 2009; Mizrahi *et al.*, 2004). Neben der Tatsache, dass mit diesen Methoden bisher noch keine detaillierte Beschreibung dendritischer Spines im Hippocampus gemacht werden konnte, sind diese Ansätze sehr invasiv. Es bleibt zu überprüfen, inwieweit das neuronale Netzwerk nach einem solchen Eingriff seinem physiologischen Zustand entspricht. Ein weiterer kritischer Aspekt bei der verwendeten *in vivo* Mikroskopie ist der Einsatz von Anästhetika, wie hier Ketamin/Xylazin oder Isofluran, die *per se* das Nervensystem und damit möglicherweise auch die kortikalen dendritischen Spines beeinflussen. Jedoch konnte eine *in vivo* Studie keinen Einfluss der Anästhesie auf die Entwicklung und die Dynamik dendritischer Spines feststellen (Yang *et al.*, 2011). Alternativ können *in vivo* Aufnahmen allerdings auch in wachen, sich bewegenden Mäusen durchgeführt werden (Dombeck *et al.*, 2007).

Als weitere Limitation der Methode haben die Ergebnisse grundsätzlich beschreibenden Charakter und mechanistische Erklärungen lassen sich nicht liefern. Diesbezüglich würde eine Kombination der *in vivo* Mikroskopie mit funktionellen Methoden, wie der Elektrophysiologie oder dem Calcium-*imaging* die Aussagemöglichkeiten substantiell verstärken. Auch eine ultrastrukturelle Analyse der bereits *in vivo* mikroskopierten Spines könnte wesentliche Zusatzinformationen liefern. Kritisch muss bemerkt werden, dass in den Untersuchungen der PS1-transgenen Mäuse und für die BACE1-*knockout* Tiere jeweils nur ein Beobachtungszeitraum von acht Tagen gewählt wurde, welcher der Definition der transienten Spines entspricht (Holtmaat *et al.*, 2005). Um auch längerfristige Effekte der Spine-Dynamik abzudecken und um aufgrund der Mehrfachbestimmung zusätzliche Datensicherheit zu gewinnen, sollten zukünftige Experimente für einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen angesetzt werden, analog zum Mikroskopie-Schema des „*Enriched Environments* seit der Geburt“ (Abbildung 30).

Ein wichtiger Aspekt der strukturellen Plastizität ist die Form der dendritischen Spines. Die Einteilung der Spines entsprechend ihrer Form in *mushroom*, *thin* und *stubby* hat funktionelle Implikationen (Bourne und Harris, 2007). Innerhalb von Minuten kann sich das Volumen von Spines nach synaptischer Aktivität vervielfachen (Matsuzaki *et al.*, 2004). Auch nach einer *Enriched Environment* Stimulation wurde in hippocampalen Neuronen eine Vergrößerung dendritischer Spines beobachtet (Kitanishi *et al.*, 2009). Die Analyse der Form von *in vivo* mikroskopierten Spines war für die hier vorgestellten Daten schwierig. Neben der Auflösungslimitation, vor allem in der z-Dimension, und Intensitätsunterschieden stellten auch Wackelartefakte der Aufnahmen in Frage, ob bei der erreichten Genauigkeit der Methode eine vertrauenswürdige und sinnvolle Vermessung der Spine-Dimensionen gewährleistet ist. Da sich, wie erwähnt, das Volumen der Spines innerhalb von Minuten ändern kann, erzeugt dies bei einer Detektion der Spines über einen Zeitraum von wenigsten vier Tagen ein zusätzliches Rauschen der Messgrößen, welches bei der Anzahl der zu analysierenden Strukturen berücksichtigt werden muss. Anhand der Daten der PS1-transgenen Mäuse wurde in dieser Arbeit die Form *in vivo* mikroskopierter dendritischer Spines exemplarisch untersucht. Die Analyse ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede.

5.8 Schlussfolgerung

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, dass die strukturelle Plastizität dendritischer Spines auf komplexe Weise reguliert wird und durch vielfältige Ereignisse moduliert werden kann. Sowohl sensorische Erfahrungen als auch eine Vielzahl von Proteinfunktionen bedingen teilweise altersabhängig die Dichte und die Dynamik dendritischer Spines. Die Proteine APP, Präsenilin1 und BACE1, die bei der Alzheimersche Erkrankung eine zentrale Rolle spielen, haben dabei zellbiologische Funktionen, die für die Ausbildung und die Aufrechterhaltung der strukturellen Plastizität von wesentlicher Bedeutung sind. Pharmakologische Maßnahmen zur Therapie oder Prävention der Alzheimerschen Krankheit, die diese Proteine zum Ziel haben, müssen daher gründlich hinsichtlich kognitiver Nebeneffekte überprüft werden. Außerdem wurde in dieser Arbeit der Stellenwert der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie für die Beschreibung der plastischen Veränderungen dendritischer Spines noch einmal unterstrichen. So sind Effekte, wie der Verlust von neu gebildeten Spines nach pharmakologischer Inhibition von BACE1, mit anderen Methoden nicht messbar.

6 Material und Methoden

6.1 Mausexperimente

6.1.1 Mauslinien

YFP-H Diese transgene Mauslinie (vollständiger Name B6.Cf-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J) wurde von Jackson Laboratory bezogen und auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J gezüchtet. Die Linie exprimiert das gelb-fluoreszierende Protein YFP unter dem neuronenspezifischen Thy1-Promotor, welches eine für diese Linie charakteristische Fluoreszenzmarkierung hippocampaler und kortikaler Nervenzellen ergibt (Abbildungen 3C und 3D) (Feng *et al.*, 2000). Die Expression des YFP im Kortex beginnt ab Tag 16 und nimmt über die folgenden Wochen stark zu, so dass ab dieser Zeit dendritische Strukturen *in vivo* und *ex vivo* mikroskopisch aufgenommen werden können (Abbildung 25). Allerdings wurde der Eindruck gewonnen, dass auch während des Alterns die Fluoreszenzmarkierung weiterhin zunahm. Zur Genotypisierung wurde mit den Primern TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG und CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG mittels PCR auf aufgereinigter DNA aus Mausschwanzbiopsien ein transgenspezifisches 300bp Fragment amplifiziert ($T_{annealing}$ 61°C, $t_{elongation}$ 45s, 35 Zyklen).

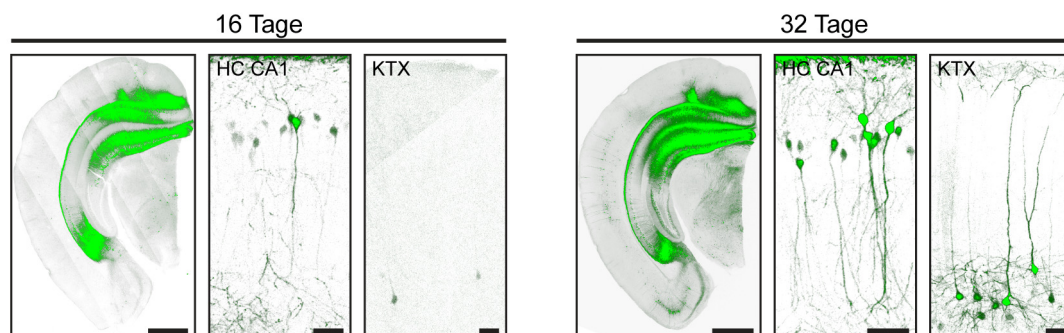


Abbildung 25. YFP-Expression im Gehirn junger YFP-H Mäuse. Die Expression des Fluorophors beginnt ab Tag 16 im Hippocampus (HC, hier spezifisch die CA1 Region dargestellt) und bedingt im Kortex (KTX) und ist an Tag 32 sehr ausgeprägt. (Maßstabsleisten: Gesamthirn 1mm; HC und KTX 50µm)

GFP-M Diese Linie (vollständiger Name B6.Cg-Tg(Thy1-EFGP)MJs/J) wurde von Jackson Laboratory bezogen und auf dem Hintergrund C57BL/6J gezüchtet. Die transgene Linie exprimiert EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotor, welches in einer Fluoreszenzmarkierung hippokampaler und kortikaler Neurone resultiert. Die Markierung ist allerdings spärlicher als in der YFP-H-Linie. Die Genotypisierung der GFP-M-Mäuse mittels PCR erfolgte mit den Primern AAT TTC ATC TGC ACC ACC G und TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG und ergab ein 173bp langes, transgenspezifisches Amplifikat ($T_{annealing}$ 60°C, $t_{elongation}$ 60s, 35 Zyklen).

APP-knockout Der APP-*knockout* wurde durch eine 200kb Deletion erreicht, die die Exone 3 bis 17 des APP-Gens umfasst (Li *et al.*, 1996). Die Mauslinie wurde von Professor Ulrike Müller zur Verfügung gestellt. Die reine Linie wurde als Inzucht mit einem gemischten C56BL/6J x 129/Ola Hintergrund geführt. Für *in vivo* mikroskopische Experimente wurde die YFP-H-Linie eingekreuzt. Die Genotypisierung der APP-*knockout*-Mäuse erfolgte mittels PCR mit den Primern CGA GAT CAG CAG CCT CTG TTC CAC A (transgenspezifisch), GAG ACG AGG ACG CTC AGT CCT AGG G (wildtypspezifisch) und ATC ACC TGG TTC TAA TCA GAG GCC C und ergab eine Wildtypbande (650-700bp) und/oder eine *knockout*-Bande (430bp) ($T_{annealing}$ 60°C, $t_{elongation}$ 60s, 35 Zyklen).

hPS1 Diese Mauslinie (auch S182 genannt) exprimiert humanes Präsenilin1 (hPS1) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotors. Die Mauslinie wurde im Labor von Professor Fred van Leuven generiert und auf einem FvB/NJ Hintergrund gezüchtet (Dewachter *et al.*, 2000). Die Genotypisierung der reinen Linie erfolgte mittels PCR mit den Primern ATT TTG GTG TGG TGG GAA TG und TCA CCT TTG GGC TTG TTT TC und ergab ein 725bp langes Amplifikat ($T_{annealing}$ 53°C, $t_{elongation}$ 60s, 35 Zyklen).

Für die Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde die hPS1-Linie mit der YFP-H-Linie verkreuzt. Für die Versuche wurden Mäuse der F2-Generation eingesetzt, die dementsprechend einen genetischen Mischhintergrund aus FvB/NJ und C57BL/6J hatten. Um eine gleiche Expression des Transgens sicher zu stellen, wurde eine quantitative *real-time* PCR etabliert, mit der die hPS1-Homozygotie getestet werden sollte. Unter Verwendung der TaqMan-Sonde TGG CTA CGT ACA GTA TTG CTC AGG TGG T, die am 3'-Ende mit einem Eclipse-*Quencher* und am 5'-Ende mit einem 6-FAM-Farbstoff modifiziert war, wurden mit den Primern TGC ACC GTT GTC CTA CTT CC und TGG CTA CGT ACA GTA TTG CTC AGG TGG T hPS1-homozygote Tiere identifiziert ($T_{annealing}$ 62°C, $t_{elongation}$ 30s, 35 Zyklen) (Abbildung 26).

FAD-PS1 Die Mauslinie exprimiert unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotors humanes Präsenilin1 mit der Mutation A246E, welche beim Menschen zu einer früheinsetzenden

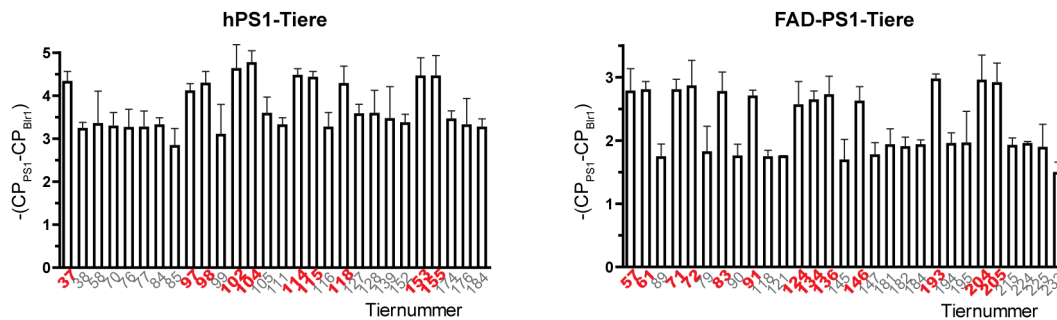


Abbildung 26. Quantitative *real-time* PCR zur Identifikation homozygoter hPS1- und FAD-PS1-Tiere. Nach Verkreuzung mit der YFP-H-Linie mussten für die *in vivo* Mikroskopie Tiere identifiziert werden, die homozygot für das Transgen hPS1 beziehungsweise FAD-PS1 waren. Eine quantitative *real-time* PCR wurde etabliert, die diese Bestimmung anhand der Häufigkeit der genomischen PS1-Sequenz relativ zum Br1-Gen erlaubt. Von den getesteten PS1-transgenen Weibchen sind die für hPS1 beziehungsweise FAD-PS1 homozygoten Tiere rot hervorgehoben, die für weitere Experimente verwendet wurden.

familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung führt. Auch diese Linie wurde auf einem FvB/NJ Hintergrund gezüchtet und im Labor von Professor Fred van Leuven generiert (Dewachter *et al.*, 2000). Das Expressionslevel des FAD-PS1 ist allerdings nur halb so hoch wie in den hPS1-Mäusen (Dewachter *et al.*, 2008). Für die *in vivo* Mikroskopie wurde auch diese Linie mit YFP-H-Mäusen verkreuzt. Da die Transgensequenzen von FAD-PS1- und hPS1-Tieren bis auf die FAD-Mutation identisch sind, wurden sowohl die Genotypisierungs-PCR für die reine Linie als auch die quantitative *real-time* PCR zur Identifizierung der verkreuzten homozygoten F2-Mäuse analog zur hPS1-Linie durchgeführt.

BACE1-knockout Für den BACE1-knockout wurde das erste kodierende Exon von BACE1 deletiert, was zu einem vollständigen Verlust der Proteinexpression führte (Cai *et al.*, 2001). Die Linie (vollständiger Name B6.129-*Bace1*^{tm1Pcw}/J) wurde von Jackson Laboratory bezogen und auf einem C57BL/6J Hintergrund gezüchtet. Für *in vivo* mikroskopische Experimente wurde die YFP-H-Linie eingekreuzt. Die Genotypisierung der BACE1-knockout Mäuse erfolgte mittels PCR mit den Primern TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG (transgenspezifisch), AGG CAG CTT TGT GGA GAT GGT G (wildtypspezifisch) und CGG GAA ATG GAA AGG CTA CTC C und ergab eine Wildtypbande (272bp) und/oder eine knockout-Bande (157bp) ($T_{\text{annealing}}$ 52°C, $t_{\text{elongation}}$ 60s, 35 Zyklen).

Zu Zuchtzwecken und teilweise als Wildtypiere für einzelne Experimente wurden außerdem die Linien **C57BL/6J** und **FvB/NJ** (beides Jackson Laboratory) verwendet.

6.1.2 Maushaltung

Grundsätzlich wurden die Mäuse in Standard-IVC-Käfigen (*individual ventilated cage*) spezifiziert pathogenfrei (SPF) in Gruppen bis zu sechs Tieren gehalten, mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus und Futter (Sniff) und Wasser *ad libitum*. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich durch optische Kontrolle überprüft. Die Zucht und die Haltung der Mäuse bis zum Experiment erfolgten in einer zentralen Tierhaltung. Mit einem Alter von drei Wochen wurden junge Mäuse abgesetzt, mit Ohrmarken zur Identifizierung versehen und für die Genotypisierung wurde eine Schwanzbiopsie entnommen.

Mindestens einen Tag vor der Operation des kranialen Fensters oder einem anderen Experiment wurden die entsprechenden Mäuse in eine externe Tierhaltung überführt. Mit dem Tag der Operation wurden die Tiere einzeln gehalten (ausgenommen die Tiere aus dem *Enriched Environment* und die operierten Jungtiere im APP-*knockout* Experiment).

Für den Umgang mit den Tieren und für alle Versuche galt der Grundsatz, die Mäuse möglichst schonend und mit möglichst geringer Schmerzbelastung zu behandeln. Es wurde entsprechend den Richtlinien des Instituts der Neuropathologie und der Regierung von Oberbayern zum Schutz der Tiere gearbeitet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden durch die Anträge zu den Tierversuchsvorhaben Az. 55.2-1-54-2531-110-06 und Az. 209.1/211-2531-67/04 geprüft und genehmigt.

6.1.3 Operation eines kranialen Fensters

Die Operation des kranialen Fensters nach der *open skull* Methode entspricht dem im Labor etablierten Protokoll von Martin Fuhrmann (Fuhrmann *et al.*, 2007). Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 27 illustriert. Vor der Operation wurden die runden Deckgläschen (Durchmesser 5mm, Menzel) mit Ethanol gesäubert und zusammen mit dem Operationsbesteck (FST) sterilisiert (Hot Bead Sterilizer, FST). Die Maus wurde gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch (0,14mg/g Ketamin, WDT/0,01 mg/g Xylazin, Bayer Health Care) anästhesiert. Zusätzlich wurde Dexamethason (6µg/g, Sigma) zur Beruhigung und Abschwellung des Gehirngewebes intraperitoneal appliziert. Zur Unterstützung der Narkose wurde teilweise eine Isofluran-Inhalationsanästhesie (Abbott; Isofluranverdampfer: Trajan808, Dräger) eingesetzt und während der Operation wurde die Maus durch ein Heizpad (FST) gewärmt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurden diese mit Bepanthen (Bayer) bedeckt. Die analgetische Wirkung der Narkose wurde durch Kneifen in den Fuß der Maus (Zwischenzehreflex) überprüft. Die Maus wurde in einen selbstgebauten Stereotakten gespannt und der Kopf mit 70% Ethanol gewaschen. Unter einem Mikroskop (Olympus SZ51 mit Kaltlicht-Schwanenhalslampe KL1500LED) wurde die Kopfhaut mit Schere und Pinzette großflächig über der Schädeldecke entfernt, ohne dabei Muskelgewebe zu verletzen. Lose Haare wurden entfernt und der Schädelknochen mit Pinzette und Skalpell gesäubert. Mit einer spitzen Injektionskanüle wurde die Schädeloberfläche aufgeraut und

mit einer Schicht Dentalkleber (Cyano Veneer, Hager Werken) überzogen, wobei die Stelle für das kraniale Fenster offen gelassen wurde. Über dem somatosensorischen Kortex wurde mit einem Dentalbohrer (Schick C1-Master, Weithas; mit rundem Stahlbohrer, Komet) kreisrund mit einem Durchmesser von 5mm die Kraniotomie angedeutet und der Schädelknochen durch vorsichtiges Bohren soweit ausgedünnt, dass sich eine Bruchlinie deutlich über dem gesamten Kreis

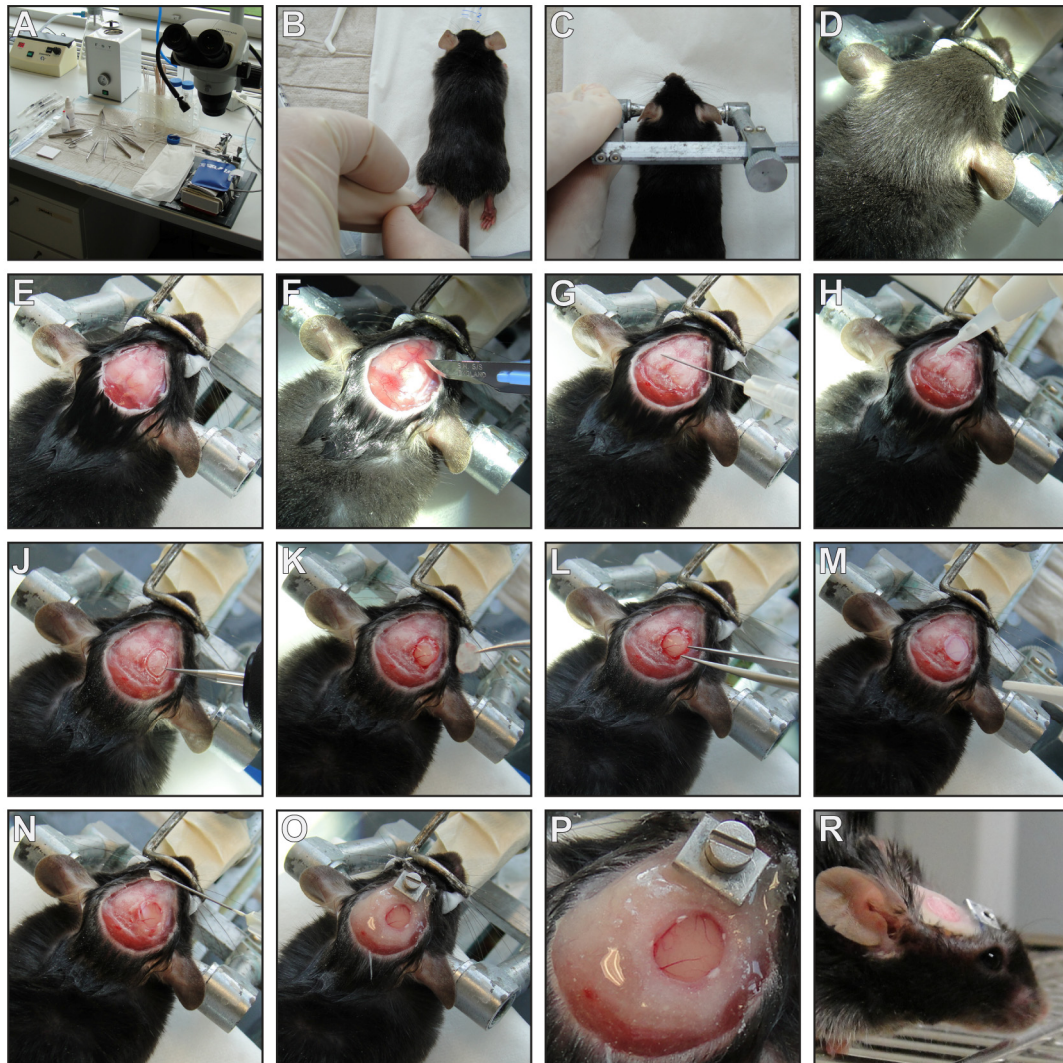


Abbildung 27. Operation des kranialen Fensters nach der *open skull* Methode. Dokumentation der einzelnen Schritte der Operation. (A) Vorbereiteter Arbeitsplatz mit sterilem Besteck, Mikroskop, Stereotakt mit Heizpad und Tischsterilisator. (B) Überprüfung der Narkose (Zwischenzehreflex). (C, D) Fixierung der Maus im Stereotakt. (E) Entfernen der Kopfhaut über dem Schädelknochen. (F) Säubern und (G) Aufrauen des Schädelknochens. (H) Auftragen des Dentalklebers. (J) Kreisförmige Bohrung über dem somatosensorischen Kortex. (K) Entfernen des frei gebohrten Knochenstücks. (L) Säubern der mit PBS bedeckten Kraniotomie. (M) Auflegen des Deckgläschens und Absaugen des PBS. (N) Fixieren des Deckgläschens mit Dentalzement. (O) Auflegen des Plättchens und Auskleiden mit Dentalzement. (P) Frisch operiertes kraniales Fenster. (R) Innerhalb von ein bis drei Stunden sollte sich eine Maus von der Operation erholt haben.

abzeichnete. Dabei wurden die Knochenspäne fortwährend entfernt und Blut mit sterilen Wattestäbchen (Böttger) aufgesogen. Über der Kraniotomie wurde ein Tropfen steriles PBS gesetzt und das kreisrunde Stück Knochen sehr vorsichtig abgehoben. Das freigelegte Areal wurde mit der Pinzette gesäubert und mit PBS gespült, wobei darauf geachtet wurde, dass die Hirnoberfläche immer befeuchtet war. Stärkere Blutungen wurden mithilfe hämostatischen Schwamm-Materials (Gelfoam, Pfizer) gestillt. Ein Deckgläschen wurde mit einem Tropfen PBS versehen, einfassend auf der frei gebohrten Stelle aufgelegt und überflüssiges PBS unter dem Fenster mit sterilen Watteschwämmchen (Sugi, Kettenbach) abgesaugt. Mit frisch angerührtem Dentalzement (Cyano Veneer, Hager Werken) wurde das Fenster an einigen Punkte fixiert, bevor die gesamte Schädelfläche mit dem Zement eingekleidet wurde. Zur späteren Fixierung der Maus unter dem Mikroskop wurde ein selbstangefertigtes Metallplättchen mit Gewinde und Schraube parallel zum Fenster ausgerichtet und in den Zement eingearbeitet. Nach der Operation wurden Carprophen (7,5µg/g, Pfizer) und Cefotaxim (0,25mg/g, Pharmore) zur analgetischen beziehungsweise antibiotischen Behandlung subkutan verabreicht. Es wurde versucht, die Operation innerhalb von 60 Minuten durchzuführen. Bis zur vollständigen Erholung von Operation und Narkose, typischerweise ein bis zwei weitere Stunden, wurden die Mäuse gewärmt. Um die Kraniotomie abheilen zu lassen, wurde bis zum ersten Mikroskopie-Zeitpunkt drei bis vier Wochen gewartet.

Bei der Operation 14 Tage alter Mäuse wurde sich an Angaben aus Holtmaat *et al.*, 2005 orientiert. Die Narkose wurde mit 0,1mg/g Ketamin und 7µg/g Xylazin schonender eingestellt. Es musste wesentlich vorsichtiger gebohrt werden, da der Schädelknochen sehr weich und nachgiebig war. Außerdem wurde versucht, möglichst wenig Zement zu verwenden, da der Schädel zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgewachsen war. Ein großes Problem war, dass junge operierte Mäuse oft nicht von ihrer Mutter erkannt beziehungsweise akzeptiert wurden (Abbildung 28A), was den Tod der Jungen bedeutete. So wurde besondere Sorgfalt darauf gelegt, dass die Tiere nur so kurz wie

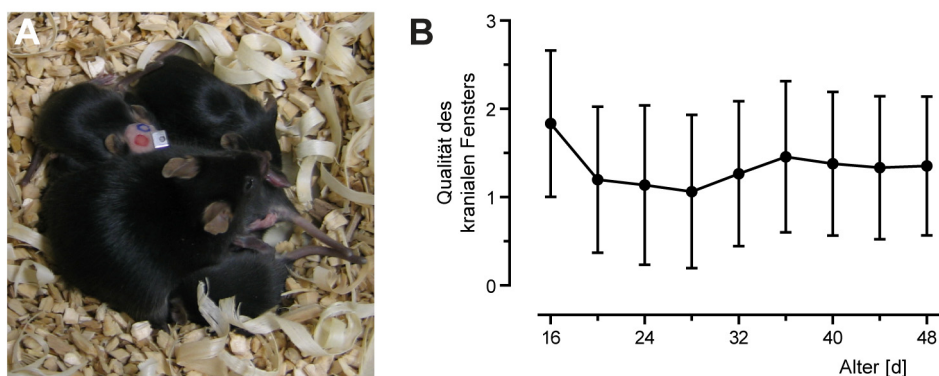


Abbildung 28. Kraniales Fenster bei jungen Mäusen. (A) Ein besonders kritischer Punkt war die Akzeptanz des operierten Jungtieres von der Mutter. (B) Einschätzung der Qualität des kranialen Fensters bei jungen Mäusen, die zwei Tage vor dem ersten Mikroskopie-Zeitpunkt operiert wurden. (0: nicht vertrauenswürdig; 1: moderat; 2: gut, 3: sehr gut mikroskopierbar; Fehlerbalken stellen \pm STDV dar)

möglich von der Mutter separiert waren und Wunden oder Blutungen vollständig versteckt wurden. Außerdem wurden die operierten Jungtiere mit dem Streu oder dem Urin der Mutter eingerieben. Bereits zwei Tage nach der Operation wurden die jungen Mäuse das erste Mal mikroskopiert, da ab diesem Zeitpunkt in den YFP-H Mäusen die Expression des Fluorophors eine Aufnahme von Dendriten ermöglichte. Aufgrund einer glialen Antwort ließ die Qualität des kranialen Fensters allerdings bereits zum zweiten Zeitpunkt deutlich nach. Diese vermindert Qualität wurde über zwei Wochen beobachtet und besserte sich danach wieder (Abbildung 28B).

6.1.4 *In vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie

Bis auf die Testung des BACE1-Inhibitors wurden alle *in vivo* mikroskopischen Experimente an einem Zeiss Axioskop 2Fs mit LSM510Meta/NLO Setup durchgeführt, welches mit dem spektral abstimmbaren Titan:Saphir-Laser (710-920nm) MaiTai XF-W1S (Spectra Physics), einen in x, y-verstellbaren motorisierten Tisch (380 FM, Luigs und Neumann), Standard Photomultiplier (Hamamatsu) und den Objektiven Achroplan IR 10x/0,3 W Ph1 (Zeiss) und Achroplan IR 40x/0,80 (Zeiss) ausgestattet war. Die Zwei-Photonen-Anregung der Fluorophore YFP und GFP erfolgte mit einer Wellenlänge von 880nm und das emittierte Licht wurde durch den Hauptstrahlteiler HFT/KP650 über einen Bandpass-Filter BP500-550 auf den Detektor geleitet. Eine Trennung des YFP und des GFP bei der simultanen Aufnahme von Dendriten und Axonen (Abbildung 14F) wurde durch den Nebenstrahlteiler FT506hq und die Bandpass-Filter BP527-582 (YFP) und BP460-500 (GFP) vor den jeweiligen Detektoren erreicht.

Die Aufnahmen der GFP-M-Mäuse für die Testung des BACE1-Inhibitors wurden an einem Zeiss LSM 7MP, ausgestattet mit einem MaiTai HP DeepSee Titan:Saphir-Laser (Spectra Physics) und einem W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC (Zeiss), durchgeführt. Auch hier wurde mit 880nm angeregt und das emittierte Licht über den Hauptstrahlteiler LP690, einen Sperrfilter SP690 und einen Bandpassfilter BP470-550 mit einem GaAsP-Detektor (Hamamatsu) registriert.

Für die *in vivo* Mikroskopie wurden die Mäuse mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch (0,12mg/g Ketamin, WDT/ 8µg/g Xylazin, Bayer Health Care) oder mit Isofluran (Abbott; Isofluranverdampfer: Trajan808, Dräger) anästhesiert und mithilfe des Plättchens mit Gewinde in einer selbstangefertigten Maushalterung fixiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit Bepanthen (Bayer) bedeckt. Das kraniale Glasfenster wurde mit einem Skalpell sorgfältig gereinigt und die Halterung mit Maus unter dem Mikroskop positioniert. Unter dem Epifluoreszenzmodus lassen sich durch das Okular die oberflächlichen Blutgefäße abbilden, die als Orientierungshilfen dienten. Daher wurde mit einer mikroskopintegrierten Kamera das charakteristische Blutgefäßmuster bestimmter Positionen fotografiert, was das Wiederfinden bereits mikroskopierter Regionen erlaubte (Abbildung 5C). Von ausgewählten Regionen wurden mit der Zwei-Photonen-Anregung Übersichtsaufnahmen der Größe 210µm x 210µm x 350µm mit dem 40x Objektiv beziehungsweise 425µm x 425µm x 350µm mit dem 20x Objektiv jeweils in einer

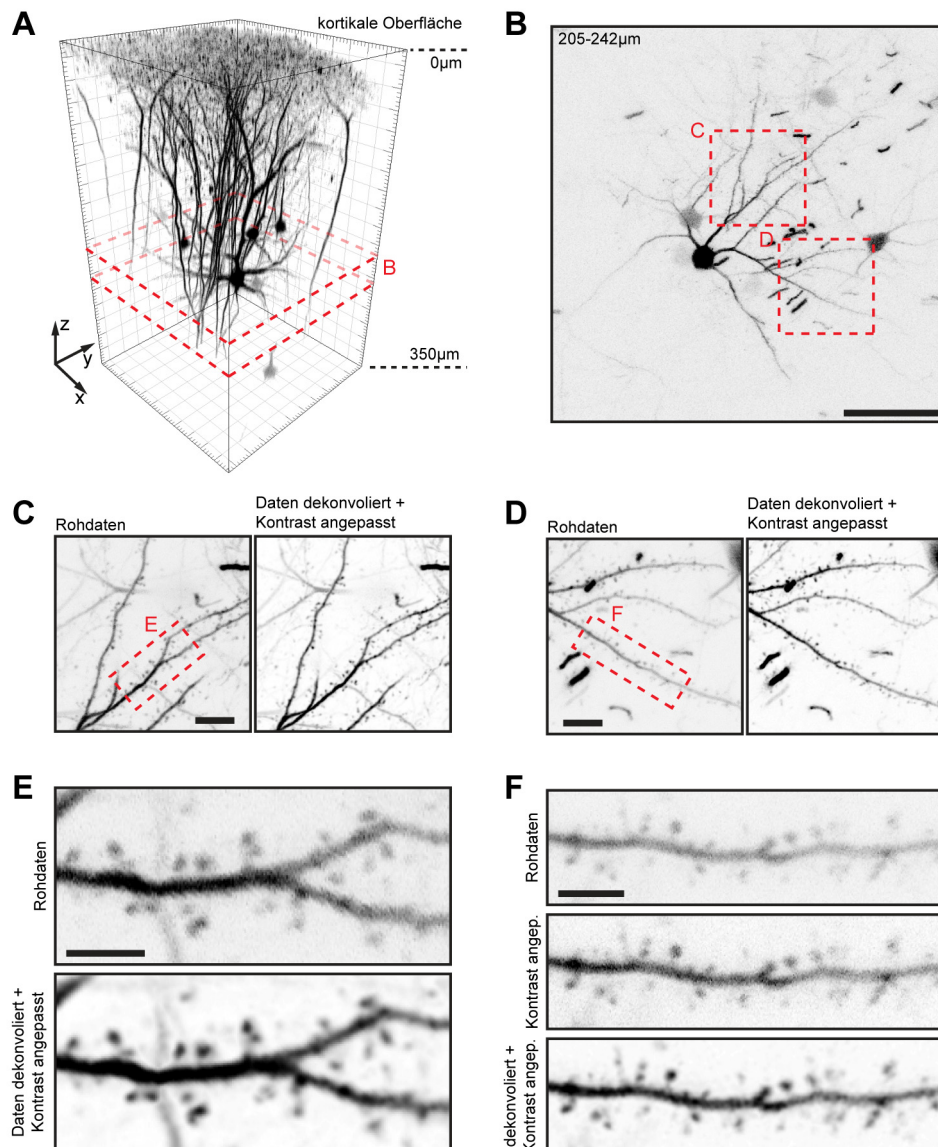


Abbildung 29. *In vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie von YFP-markierten Dendriten. (A) Volumengerenderte Darstellung einer typischen dreidimensionalen Übersichtsaufnahme kortikaler Neurone in einer YFP-H-Maus über eine Tiefe von 350µm. (B) z-Projektion des in (A) hervorgehobenen Bereichs in einer Tiefe von etwa 200-250µm mit einem Schicht II/III Neuron und den lateral ausgehenden basalen Dendriten. (Maßstabsleiste 50µm) (C, D) Beispiele für hochauflösende Detailaufnahmen (z-Projektionen) von Dendritenabschnitten. Diese Art von Aufnahmen bildete die Grundlage für alle Analysen zu dendritischen Spines, die in dieser Arbeit vorgestellt werden. Jeweils links abgebildet ist der Bilddatensatz ohne Bearbeitung (bis auf die Invertierung). Zu Abbildungszwecken wurden die Daten dekonvolviert und der Kontrast wurde angepasst, rechts dargestellt. (Maßstabsleiste 10µm) (E, F) Ausschnitte für zwei typische Dendritenabschnitte aus (C) beziehungsweise (D) als Rohdatei und nach Bildbearbeitung. Die Beispiele verdeutlichen, dass mit der verwendeten Dekonvolution die Auflösung der Bilder verbessert und das Signalrauschen reduziert wurde, dass jedoch keine Artefakte durch die Bearbeitung eingeführt wurden. (Maßstabsleiste 5µm)

Auflösung von 0,4µm/Pixel und einem Einzelbildabstand von 3µm gemacht (Abbildung 29A). Dabei wurde die Laserintensität über die Tiefe der Aufnahme angepasst. Einerseits erfassten diese Übersichtsaufnahmen alle kortikalen Neurone der Schicht II/III, die typischerweise in einer Tiefe von 200-300µm zu finden sind. Entsprechende apikale Dendriten konnten diesen Neuronen direkt zugeordnet werden. Alle Dendriten, die über diese Übersichten hinausgehen, wurden folglich als apikale Dendriten der Schicht V Neurone klassifiziert. Weiterhin wurden innerhalb dieser Übersichtsaufnahmen die Dendritenabschnitte lokalisiert, an denen die Daten zu den dendritischen Spines erhoben wurden. Diese Dendriten wurden als kleinerer Ausschnitt mit einer hohen Auflösung von 0,1µm/Pixel und einem z-Abstand der Einzelbilder von 1µm mikroskopiert (Abbildungen 29B-D). Die stufenweise Aufnahme dieser Dendritenabschnitte erlaubte bei der chronischen Zwei-Photonen-Mikroskopie die repetitive und genaue Relokalisation der gewünschten Strukturen. Auf diese Weise wurden 7-16 Dendriten pro Maus mikroskopiert, wobei eine Mikroskopiesitzung nicht länger als eine Stunde dauern sollte. Es wurde darauf geachtet, dass die Signalintensität der Fluoreszenz innerhalb des mikroskopierten Volumens und über die Zeit konstant gehalten wurde. Dabei wurde die Leistung der Anregungsenergie unter 50mW gehalten, um phototoxischen Effekten vorzubeugen.

6.1.5 *Enriched Environment*

Zur generellen sensorischen Stimulation wurde ein komplexes *Enriched Environment* eingerichtet (Sztainberg und Chen, 2010; van Praag *et al.*, 2000). Es wurde ein größerer Käfig eingesetzt (80cm x 50cm x 40cm), verglichen mit den Standard-IVC-Käfigen (30cm x 15cm x 20cm), in welchen die entsprechenden Kontrollen gehalten wurden. Der Käfig war mit unterschiedlichem Nestmaterial, mit Tunneln, Hütten, Plattformen und anderem Spielzeug aus Holz, Plastik, Papier, Metall oder Glas und von unterschiedlicher Textur ausgestattet. Zusätzlich befanden sich in dem Käfig mindestens zwei Laufräder, die die Möglichkeit zu freiwilliger physischer Aktivität gaben (Abbildung 10A). Der Inhalt des Käfigs wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht und umgeräumt und auch die Orte für die Futter- und Trinkmöglichkeiten wurden variiert. Für die Experimente wurden ausschließlich Weibchen eingesetzt, von denen wenigstens fünf und maximal zehn im *Enriched*-Käfig gehalten wurden. War die Anzahl der Tiere zu klein, wurden zusätzliche Weibchen in den Käfig gesetzt, die nicht mikroskopiert wurden. Allerdings wurden während eines Experiments keine neuen Mäuse in das *Enrichment* eingeführt.

Für den Versuch „*Enriched Environment* seit der Geburt“ wurden schwangere YFP-H-Mäuse in den *Enriched*-Käfig gesetzt. Nach der Geburt wurde das Umräumen des Käfigs für zehn Tage gestoppt, um die jungen Mütter und die Babies keinem unnötigen Stress auszusetzen. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Mütter und die männlichen Geschwister aus dem Käfig genommen und eine Schwanzbiopsie der weiblichen Jungtiere für die Genotypisierung genommen.

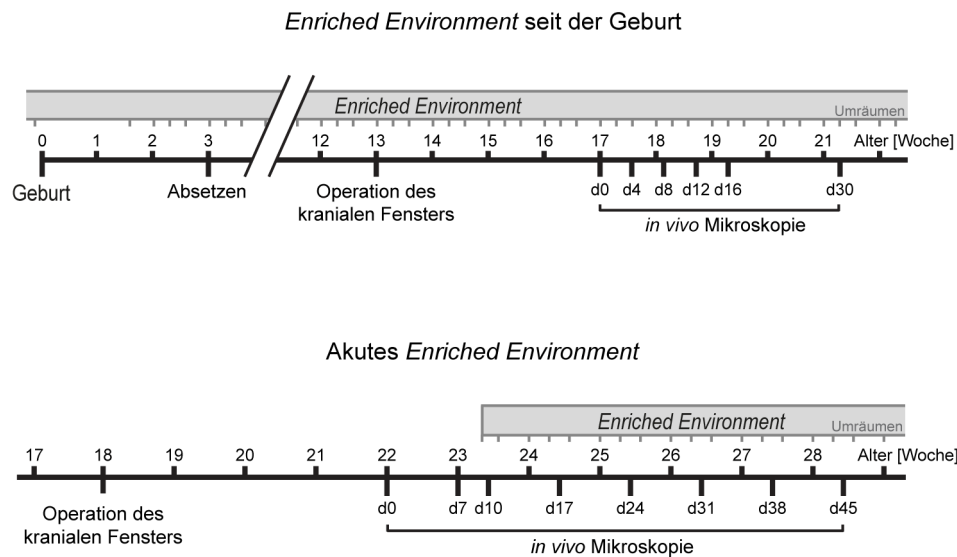


Abbildung 30. Experimenteller Zeitplan für die Versuche mit dem *Enriched Environment*. Für das „*Enriched Environment* seit der Geburt“ wurden schwangere YFP-H Mäuse in den *Enriched*-Käfig gesetzt. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Mütter und die männlichen Geschwister aus dem Käfig genommen und den verbleibenden weiblichen YFP-H Tieren mit drei Monaten (13 Wochen) ein kraniales Fenster implantiert. Vier Wochen später wurde mit der *in vivo* Mikroskopie der kortikalen Dendriten begonnen. Bei dem akuten *Enriched Environment* erfolgte die Operation des kranialen Fensters bei YFP-H Mäusen in einem Alter von vier bis fünf Monaten. Nach der obligatorischen Erholungsphase von drei bis vier Wochen wurde zu zwei Zeitpunkten der Kontrollstatus der dendritischen Spines mit der *in vivo* Mikroskopie aufgenommen, bevor die Mäuse in das *Enriched Environment* gesetzt wurden und der Effekt an den identischen Dendriten über 35 Tage verfolgt wurde.

Nach der Operation des kranialen Fensters oder nach einer Mikroskopiesitzung wurden die Mäuse isoliert gehalten, bis sie sich vollständig von der Narkose erholt hatten und wieder in den *Enriched*-Käfig gesetzt werden konnten. In Abbildung 30 ist noch einmal der konkrete Ablauf der beiden Experimente des *Enriched Environments* schematisch zusammengefasst.

6.1.6 Injektion lentiviraler Vektoren

Für die Etablierung der Injektion lentiviraler Vektoren wurde sich an dem Protokoll von Cetin *et al.*, 2006 orientiert. Es wurden kalibrierte Mikroglasspitten (5µl, Hirschmann) für die Injektion verwendet, die nach einem optimierten Programm (*temp*: 530; *pull*: 75; *velo* 100; *time*: 75) mit einem Mikropipettenpuller (P-87, Sutter Instruments) zu einer langen, dünnen Spitze gezogen wurden. Diese wurde mit einer Schere geschnitten. Auf diese Weise wurden Pipettenspitzen mit einem Innendurchmesser von etwa 10µm und einem Außendurchmesser von etwa 25µm erzeugt (Abbildung 31A). Die Pipetten wurden an dem Tag der jeweiligen Injektion frisch gezogen und die Ausmaße unter einem Mikroskop kontrolliert. Zur Abmessung des Injektionsvolumens wurden die Pipetten mit einem wasserfesten Stift skaliert, wobei der Skalierungsabstand von 1mm einem

Volumen von 60nl entsprach (Abbildung 31A). Die Mikropipetten wurden in einen Pipettenhalter gespannt und über ein Schlauchsystem mit einer 20ml Spritze verbunden, mit der der Unter- und Überdruck zum Befüllen beziehungsweise Entladen der Pipette erzeugt wurde.

Die lentiviralen Vektoren wurden während der Operation des kranialen Fensters oder in einer separaten Operation appliziert, bei der die Anästhesie und die Vorbereitung der Maus der Prozedur der Fensteroperation entsprach. Erfolgte die Injektion kontralateral zum kranialen Fenster, wurden über dem entsprechenden somatosensorischen Kortex vorsichtig kleine Bohrungen gesetzt (Duchmesser 1mm; Dentalbohrer: Schick C1-Master, Weithas; mit rundem Stahlbohrer, Komet), wobei das letzte Stück Knochen mit einer Kanüle entfernt wurde. Zur Orientierung ist in Abbildung 31C die Lage des somatosensorischen Kortex schematisch abgebildet.

Die Lösung der viralen Vektoren wurde auf Eis aufgetaut und die Mikropipette unter Sicht mit einem Mikroskop (OpMi-1, Zeiss) beladen. Mikromanipulatoren (Luigs und Neuman) erlaubten dabei eine mikrometergenaue Positionierung der Pipette im Raum (Abbildung 31B). Die Pipette wurde senkrecht über der Kraniotomie platziert und vorsichtig auf die Gehirnoberfläche aufgesetzt. Langsam wurde die Pipette ausschließlich in z-Richtung in das Gewebe gefahren, wobei die Eindringtiefe über die Digitalanzeige des Mikromanipulators verfolgt wurde. Mithilfe der Spritze wurde die Viruslösung langsam (etwa 100nl pro Minute) mit einem Volumen von 100nl pro Injektionsstelle appliziert, welches über die skalierte Pipette verfolgt wurde. Eine weitere Minute wurde gewartet bevor die Pipette sehr langsam wieder herausgefahren wurde. Separate Injektionskraniotomien wurden direkt mit Dentalzement (Cyano Veneer, Hager Werken) geschlossen. Nach Injektionen innerhalb eines kranialen Fensters wurde das PBS über der Kraniotomie fünfmal ausgetauscht, um ausgetretene Viruspartikel zu verdünnen, bevor das Fenster durch das Deckgläschen verschlossen wurde.

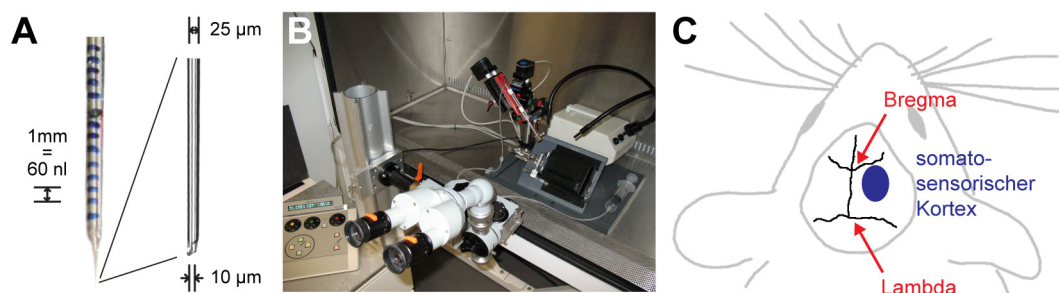


Abbildung 31. Setup für die Injektion lentiviraler Vektoren. (A) Skalierte Glaspipette mit gezogener, geschnittener Spitze. (B) Separierter Virusinjektionsplatz, an dem unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2 gearbeitet werden konnte. Abgebildet sind die Maushalterung, das Mikroskop und die motorisierten Mikromanipulatoren mit dem Pipettenhalter. (C) Schematisch angedeutet ist die Position des somatosensorischen Kortex, die sich anhand der stereotaktischen Bezugspunkte des Schädels, dem Bregma und dem Lambda, bestimmen lässt.

6.1.7 Testung des BACE1-Inhibitors SCH-1682496

Der BACE1-Inhibitor SCH-1682496 ((S)-6-(3-chloro-5-(5-(prop-1-yn-1-yl) pyridine-3-yl) thiophen-2-yl)-2-imino-3, 6-dimethyl-tetrahydropyrimidin-4(1H)-on) (Abbildung 32A) wurde von der Firma Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals entwickelt (Scott *et al.*, 2011) und entsprechend den Patentangaben (WO2007146225 und WO2008103351) von der Firma Lundbeck A/S nachsynthetisiert. Der Inhibitor wurde in 10%HP β CD (10% Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 240mM Glucose, pH4 mit Methansulfonsäure) mit einer finalen Konzentration von 10mg/ml gelöst.

Die Effektivität des Inhibitors wurde von der Firma Lundbeck A/S bestimmt. Dazu wurden drei Monate alte männliche C57BL/6J Mäuse mit dem Inhibitor bis zu 14 Tage alle 12 Stunden *per os* in den Konzentrationen 30mg/kg und 100mg/kg behandelt. Die A β 40-Level wurden aus den Homogenaten von kortikalem Gehirngewebe und aus Blutplasmaproben mit einem Elisa-Kit (Wako Pure Chemical Industries) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt (Abbildung 32C).

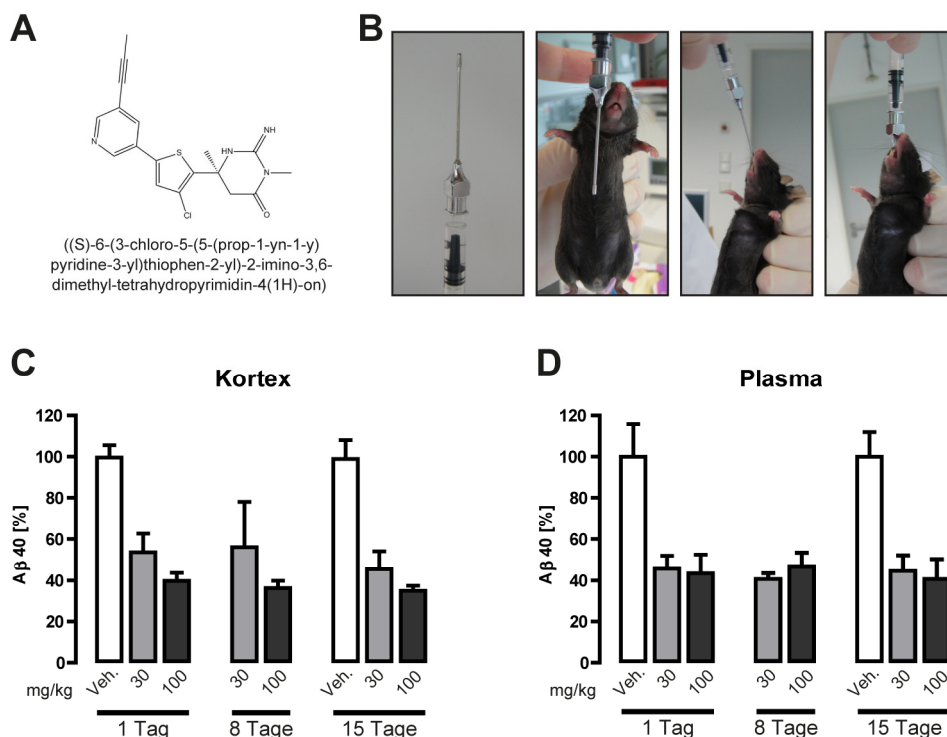


Abbildung 32. Applikation und Effektivität des BACE1-Inhibitors SCH-1682496. (A) Chemische Struktur des BACE1-Inhibitors SCH-1682496 (B) Orale Applikation (*per os*) von Substanzen mithilfe einer Magensonde. Die Maus wurde mit Isofluran betäubt, die Magensonde wurde vorsichtig eingeführt (man beachte, dass die Sonde bis unterhalb des Brustbeins eingeführt werden muss) und die Substanz langsam appliziert. (C, D) Reduktion der A β 40 Level im murinen Kortex (C) und im Plasma (D) nach akuter (1 Tag) und chronischer (8 beziehungsweise 15 Tage) Behandlung mittels Magensonde mit niedriger (30mg/kg) und hoher (100mg/kg) Dosis des BACE1-Inhibitors und mit der Vehikelkontrolle.

Für die Zwei-Photonen-mikroskopische Analyse des Effekts der BACE1-Inhibitor auf dendritische Spines wurden drei Monate alte GFP-M Mäuse verwendet. Während der Behandlungsphase wurde den Mäusen über 16 Tage alle 12 Stunden der Inhibitor (100mg/kg) oder der Kontrollgruppe das Lösungsmittel mit einer Magensonde (FST) appliziert (Abbildung 32B). Eine möglichst stressarme orale Applikation wurde durch eine kurze Narkose der Mäuse mit Isofluran (Abbott; Isofluranverdampfer: Trajan808, Dräger) gewährleistet.

6.1.8 Perfusion und Fixierung von Gehirngewebe

Zur Perfusion von Gehirngewebe wurden die Mäuse mit Isofluran (Abbott; Isofluranverdampfer: Trajan808, Dräger) oder mit Ketamin/Xylazin (0,14mg/g Ketamin, WDT/0,01 mg/g Xylazin, Bayer Health Care) anästhesiert und an den Gliedmaßen fixiert. Nacheinander wurden Bauchdecke und Brustkorb geöffnet und das schlagende Herz freigelegt. Eine Flügelkanüle wurde in die linke Herzkammer gestochen, über die PBS aus einem erhöht hängenden Reservoir in den Blutkreislauf geleitet wurde. Gleichzeitig wurde das rechte Herzohr geöffnet, um den Ausfluss des Blutes zu gewährleisten. Nachdem der Blutkreislauf vollständig mit PBS gespült war, wurde über eine zweite Flügelkanüle 4% PFA (4% Paraformaldehyd in PBS) eingeleitet. Die erfolgreiche Fixierung konnte anhand des sich ringelnden Schwanzes und der Versteifung des Mausekörpers kontrolliert werden. Anschließend wurde das Gehirn präpariert und in 4% PFA bei 4°C über Nacht postfixiert. Fixierte Gehirne wurden in PBS bei 4°C gelagert.

6.2 Immunhistochemische Methoden

6.2.1 Präparation und immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistologische Präparate für die Darstellung der transgenen oder viralvermittelten Expression von GFP beziehungsweise YFP angefertigt, um das endogene Fluoreszenzsignal zu verstärken. Koronare Schnitte (100µm) wurden mit einem Vibratom (Leica VT1000S) von PFA-fixiertem Gehirngewebe angefertigt. Die Schnitte wurden in 12-well Platten freischwimmend prozessiert (*free floating sections*). Die Permealisierung erfolgte in 2% PBS-T (PBS-Triton X-100) über Nacht. Für das verwendete Protokoll war eine Blockierung nicht notwendig. Die Inkubation mit dem direkt markierten Antikörper antiGFP-Alexa488 (1:100; A21311, Invitrogen) in 5% BSA, 0,1% PBS-T erfolgte über Nacht. Der Antikörper bindet spezifisch GFP, sowie das verwandte YFP. Nach anschließendem dreifachem Waschen mit 0,1% PBS-T wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckelt.

6.2.2 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning Aufnahmen der immunhistochemischen Schnitte wurden mit einem inversen LSM 510 Mikroskop von Zeiss angefertigt. Die Anregung des Alexa488 erfolgte mit einem Argonlaser (488nm) und das emittierte Fluoreszenzlicht wurde über einen Bandpass-Filter (500-550nm) mit einem Hamamatsu-Detektor registriert. Die Übersichtsaufnahmen ganzer Hemisphären wurden im *tilescan*-Modus mit einem Plan-Neofluar 10x/0,3 Objektiv gemacht. Für Detailaufnahmen wurde ein Plan-Apo 40x/1,3 DIC Ölimmersionsobjektiv verwendet.

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 DNA-Präparation aus Mausschwanzbiopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien für die Genotypisierungen erfolgte mit dem pegGold Tissue DNA Mini Kit (Peglab) in 96-well Platten entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Biopsien wurden über Nacht in 400µl Lyse-Puffer mit ProteinaseK und RNase bei 50°C inkubiert. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 10000U/min (Eppendorf Zentrifuge 5804) wurden zum Überstand 400µl DNA-Bindepuffer pipettiert, die Säulen (*PerfectBind DNA Column*) beladen und erneut zentrifugiert (eine Minute, 10000U/min). Die Elution der genomischen DNA mit 200µl Elutionspuffer (drei Minuten Inkubation und eine Minute Zentrifugation bei 6000 U/min) erfolgte nach zweimaligem Waschen (Waschpuffer, eine Minute, 10000U/min). Die isolierte Mausschwanz-DNA wurde bei 4°C gelagert.

6.3.2 PCR

Die Amplifikation der DNA-Sequenzen für die Genotypisierung und die Klonierung des lentiviralen Vektorkonstrukts erfolgte mittels PCR (*polymerase chain reaction*). Standardmäßig wurden 1µl genomische Maus-DNA beziehungsweise 5ng Plasmid-DNA, 1-10µM eines jeden Primers (MWG Eurofins) und der 5Prime HotMasterMix (VWR) eingesetzt. Die PCRs wurden an Mastercycler pro Thermozyklern (Eppendorf) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt: (1) Prä-Denaturieren: 94°C für 0,5-3min; (2) 25-35 Zyklen: $T_{\text{denaturieren}}$ 94°C für $t_{\text{denaturieren}}$ 30s; $T_{\text{annealing}}$ entsprechend den Primern für $t_{\text{annealing}}$ 30s; $T_{\text{elongation}}$ 72°C für $t_{\text{elongation}}$ entsprechend Amplifikatlänge; (3) abschließende Elongation 72°C für 10min; (4) 4°C Kühlung. Die Amplifikate wurden auf Sybr-Gold-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer: C.B.S. Scientific) und die Gele mit einem Kamerasystem (Canon Powershot G1, Software: Remote-Capture) auf einem UV-Tisch (3UV Transilluminator, UVP) dokumentiert.

6.3.3 Quantitative *real-time* PCR

Zur Identifikation homozygoter PS1-transgener Mäuse wurde eine *real-time* PCR nach der TaqMan-Methode etabliert. Die entsprechende spezifische Sonde TGG CTA CGT ACA GTA TTG CTC AGG TGG T für die humane PS1-Sequenz wurde am 3'-Ende mit einem Eclipse-*Quencher* und am 5'-Ende mit einem 6-FAM-Farbstoff modifiziert (Eurogentec). Als interne Kontrolle wurde außerdem eine PCR für das Gen Blr1 (Burkitt-Lymphom-Rezeptor 1) mit der 3'-Eclipse, 5'-Yakima Yellow markierten Sonde CTG TTC CAC CTC GCA GTA GCC GAC (Eurogentec) und den Primern CGG AGC TCA ACC GAG ACC T und TGC AAA AGG CAG GAT GAA GA mitgeführt. Die *real-time* PCR erfolgte am Lightcycler2.0 (Roche) in den entsprechenden 20µl Lightcycler Kapillaren (Roche) unter Verwendung des Lightcycler FastStart DNA-Master^{plus} Kit (Roche), zu dem 2µM eines

jeden Primers, 2µM einer jeden Sonde und 4µl aufgereinigter Mausschwanz-DNA pipettiert wurden. Folgendes PCR-Programm wurde benutzt: (1) 50°C für 2min; (2) 95°C für 10min; (3) 40 Zyklen: 95°C für 15s, 60°C für 60s; (4) 40°C für 30s. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde für PS1 (6-FAM) bei 530nm, für Blr1 (Yakima Yellow) bei 560nm detektiert und die CP-Werte (*crossing point*, Anstiegspunkt der Fluoreszenz) als $-(CP_{PS1} - CP_{Blr1})$ aufgetragen (Abbildung 26).

6.3.4 Klonierung des viralen Vektorkonstrukts

Von einem Plasmid mit der Sequenz des murinen Promotors der α -Calcium-/Calmodulin-abhängigen Kinase II (Dittgen *et al.*, 2004) wurden mit der Phusion Polymerase (New England Biolabs) und den Primern für das CaMKII(0,4kb)-Fragment CCC TTA ATT AAC TTG TGG ACT AAG TTT GTT CAC ATC CC und GCT CTA GAG CTG CCC CCA GAA CTA GGG GCC ACT CG beziehungsweise für das CaMKII(1,3kb)-Fragment CCC TTA ATT AAC ATT ATG GCC TTA GGT CAC TT und GCT CTA GAG CTG CCC CCA GAA CTA GGG GCC ACT CG die entsprechenden Promotorbereiche mit einer hohen Genauigkeit amplifiziert. Die Amplifikate wurden mittels Ethidiumbromid-Agarosegelen elektrophoretisch getrennt (Elektrophoresekammer: Kisker Biotech), die Banden mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch (3UV Transilluminator, UVP) ausgeschnitten und die DNA-Fragmente entsprechend den Herstellerangaben mit dem Gelextraktions-Kit von Qiagen isoliert.

Mit den Restriktionsenzymen ClaI und AgeI (beide New England Biolabs) wurden das Vektorplasmid (Addgene plasmid 12252 aus dem Labor von Didier Trono) und die Promotorfragmente für zwei Stunden bei 37°C geschnitten, um komplementär überhängende Enden zu erzeugen. Die Fragmente wurden erneut elektrophoretisch getrennt und isoliert. Für die Ligation wurden 25ng Vektor und 5ng CaMKII(0,4kb)-Fragment beziehungsweise 15ng CaMKII(1,3kb)-Fragment eingesetzt und mit der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde vollständig für die Transformation chemokompetenter Bakterien (XL1-blue) eingesetzt. Die Transformation erfolgte bei 30 Minuten auf Eis, anschließenden 40 Sekunden bei 42°C und nach Zugabe von antibiotikafreiem LB-Medium weiteren 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln. Auf Ampicilin-haltigen LB-Agarplatten wurden die Ansätze ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit einzelnen Kolonien wurden 5ml Übernachtskulturen angeimpft, die Bakterien anschließend abzentrifugiert, in LösungI_{Miniprep} resuspendiert und mit LösungII_{Miniprep} gemischt. Nach Zugabe von LösungIII_{Miniprep} wurde zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem klaren Überstand mit Ethanol gefällt. Mit ausgewählten Kontrollrestriktionen (analog der Beschreibung oben, Enzyme New England Biolabs) wurde überprüft, ob die Insertion der Promotorfragmente erfolgreich war und der richtigen Orientierung entsprach. Mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) wurden die entsprechenden Plasmide in großem Maßstab amplifiziert und aufgereinigt und mit einer

Sequenzierung überprüft. In analoger Weise wurden die Helferplasmide für die Präparation der lentiviralen Vektoren amplifiziert.

Zur Bestimmung der Konzentration und der Reinheit wurden die DNA-Lösungen mit dem Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) vermessen.

6.3.5 Präparation lentiviraler Vektoren

Als virales Vektorsystem wurden lentivirale Vektoren der dritten Generation verwendet (Dull *et al.*, 1998). Die Präparation der lentiviralen Vektorpartikel erfolgte im Labor von Professor Martin Biel, in Zusammenarbeit mit Dr. Stykianos Michalakis. Auf Poly-L-Lysin beschichteten 15cm Zellkulturschalen wurden HEK 293T Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-80% gezogen. Mithilfe der Kalziumphosphatpräzipitation wurden die Zellen mit den Vektorplasmiden LV-CaMKII(0,4kb)-GFP oder LV-CaMKII(1,3kb)-GFP und den drei Helferplasmiden pMDLg/pRRE (Addgene Plasmid 12251; *gag* und *pol* Gene), pRSV-Rev (Addgene Plasmid 12253; *rev* Gen) und pMD2.G (Addgene Plasmid 12259, *vsv-g* Gen für das Oberflächenglycoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus) transfiziert (Dull *et al.*, 1998).

Aus den Zellkulturüberständen des zweiten und des dritten Tages nach der Transfektion wurden die Viruspartikel mit 19400U/min bei 17°C für zwei Stunden abzentrifugiert (Zentrifugenröhrchen Beckman&Coulter; Zentrifuge Beckman&Coulter Optima LE80K mit Rotor SW 28) und in HBSS (Gibco) resuspendiert. Die Virusernten der beiden Tage wurden vereint und auf ein vorgelegtes Sucrosekissen (20%) in Zentrifugenröhrchen (Beckman&Coulter) pipettiert. Das Pellet der anschließenden Zentrifugation mit 21000U/min für zwei Stunden bei 17°C (Zentrifuge Beckman&Coulter Optima LE80K mit Rotor SW 55) wurde in HBSS gelöst und bei -80°C gelagert. Der Titer der Viruspräparationen wurde mit dem *Reverse Transcriptase Assay* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben abgeschätzt.

6.4 Proteinbiochemische Arbeiten

6.4.1 Herstellen von Großhirnhomogenaten

Für Westernblotanalysen wurden Großhirnhomogenate von hPS1-, FAD-PS1- und Wildtyp-Tieren angefertigt, aus denen anschließend auch eine grobe Synaptosomenfraktion angereichert wurde. Um für die Synaptosomenpräparation ausreichend Gewebematerial zu haben, wurden pro Ansatz die Großhirne von zwei Mäusen eingesetzt, mit drei Ansätzen pro Genotyp. Die bei -80°C gelagerten Gehirne wurden eingewogen und mit 10ml pro Gramm gekühlter Lösung_{Synprep} versetzt. Auf Eis wurde mit einem gekühlten Glas-Teflon-Homogenisator (PotterS, Sartorius) das Gehirngewebe mit zehn Schlägen aufgeschlossen. 1ml wurde als Großhirnhomogenatprobe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das restliche Homogenat wurde für die Synaptosomenpräparation eingesetzt.

6.4.2 Synaptosomenpräparation

Die Isolierung der Synaptosomen erfolgte nach einem bereits etablierten Protokoll (Nicholls, 1978) (Abbildung 33A). In der Kühlzentrifuge (Eppendorf 5819R) wurde das Großhirnhomogenat für zwei Minuten bei 4°C und $3050\times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 12 Minuten bei 4°C und $15000\times g$ zentrifugiert (Eppendorf 5819R) und das Pellet in 1ml gekühlter Lösung_{Synprep} resuspendiert. In Ultrazentrifugenröhrchen (Thermo Scientific) wurde ein gekühlter Ficoll-Gradient (4%/6%/13% in Lösung_{Synprep}) vorbereitet und das gelöste Pellet vorsichtig aufgetragen. Nach

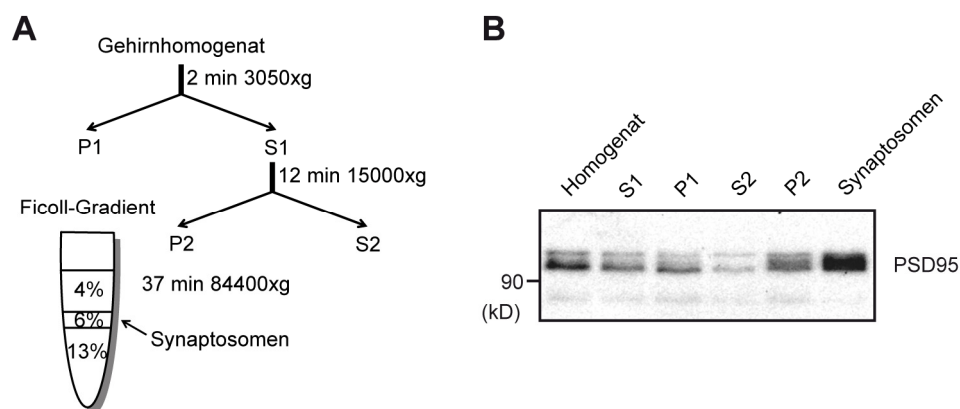


Abbildung 33. Präparation einer groben Synaptosomenfraktion. (A) Zentrifugationsschritte zur Isolierung der Synaptosomen. Im ersten Zentrifugationsschritt wurde nichtaufgeschlossenes Gehirngewebe abzentrifugiert. Die Zellbestandteile wurden anschließend pelletiert. Mittels Ultrazentrifugation sammelten sich die Synaptosomen im Ficoll-Gradienten in der 6% Fraktion an und konnten so von Zellorganellen und Myelinbestandteilen getrennt werden. **(B)** Die Anreicherung des postsynaptischen Proteins PSD95 wurde mittels Immunblot (ab12093, Abcam) über die verschiedenen Zentrifugationsschritte verfolgt.

Ultrazentrifugation (Sorvall Discovery 90SE, Rotor TH-641) bei 4°C und 84400xg für 37 Minuten wurde die synaptosomenhaltige 6% Ficoll-Fraktion mit einer Pasteurpipette vorsichtig isoliert. Zur Überprüfung der Synaptosomenaufreinigung wurde die Anreicherung des postsynaptischen Proteins PSD95 in den einzelnen Fraktionen mittels Westernblot verfolgt (Abbildung 33B). Der Proteingehalt der Synaptosomenpräparationen wurde photometrisch nach der Bradfordmethode bestimmt (Coomassie Plus Protein Assay, Thermo Scientific; bioPhotometer, Eppendorf) und mit gekühlter LösungII_{Synprep} auf eine Proteinkonzentration von 1mg/ml eingestellt. Die Synaptosomenfraktionen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

6.4.3 Westernblotanalyse

Für Westernblotanalysen wurden pro Probe 7,5µg Gesamtprotein eingesetzt und durch Aufkochen mit Gelladepuffer denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte anhand der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 12%igem Trenngel beziehungsweise für den Ryanodin-Rezeptor-Ansatz mit 8%igem Trenngel (Elektrophoresekammer: Mini-Protean, Biorad). Die Proteine wurden mit der *semidry*-Methode (Blotkammer: Semi-Dry-Blotter, Peqlab) oder für den Ryanodin-Rezeptor-Ansatz mit der *wet*-Methode (Blotkammer: Tank Blot System, Biorad) auf PVDF-Membranen (Immobilon-P, Millipore) geblottet. Auf der Membran wurden die Proteine durch zehn Sekunden Methanol-Behandlung fixiert. Zur Lagerung wurden trockene Membranen in Klarsichtfolie eingeschlagen und bei -20°C aufbewahrt. Geblockt und gewaschen wurden die Blotmembranen mit 5%iger Blocklösung. Die Antikörper wurden ebenfalls in dieser Lösung verdünnt und es wurde bei mehrfacher Verwendung zusätzlich 0,01% Natriumazid zugesetzt. Folgende Primärantikörper wurden bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden verwendet: für die APP-CTFs CT15 (1:5000, ein Geschenk von Dr. Pietrzik und Dr. Koo), für das EphA4-CTF sc-921 (1:1000, Santa Cruz), für das N-Cadherin-CTF 6199 (1:2500, BD Biosciences), für den Ryanodin-Rezeptor ma3-925 (1:5000, Thermo Scientific), für Tubulin sc-51502 (1:1000, Santa Cruz) und für PSD95 ab12093 (1:2500, Abcam). Die entsprechenden sekundären Antikörper waren an die alkalische Phosphatase gekoppelt (Thermo Scientific) und wurden 1:5000 eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Detektion erfolgte unter Verwendung des CDP-Star Reagenz (Roche) mit dem Chemocam Imager (Intas Science Imaging Instruments). Eine Quantifizierung der Banden wurde mithilfe der entsprechenden Funktion in der Bildauswertesoftware ImageJ durchgeführt. Um auf Blotmembranen mehrfach hintereinander Proteine zu detektieren, wurden die Membranen für 30 Minuten bei 37°C gestriipt und vor einem erneuten Block ausgiebig gewaschen.

6.5 Computergestützte Datenauswertung

6.5.1 Auswertung der Spinedaten

Die Datenauswertung zur Dichte und Kinetik dendritischer Spines erfolgte mittels kontrastangepasster Rohdaten in den Programmen LSM Image Browser (Zeiss) oder Zen (Zeiss) als drei- beziehungsweise vierdimensionale Bildstapel. Dabei wurden die Daten von Experiment- und Kontrollgruppen gleichzeitig und verblindet ausgewertet. Als Spines wurden die primär lateral von aufgenommenen Dendritenabschnitten abgehenden Strukturen erfasst, die nach eigenem Ermessen die entsprechende Form und Größenordnung hatten. In Zeitserien wurden die Dendriten eines jeweiligen Zeitpunkts mit dem vorherigen Zeitpunkt verglichen und für jeden Spine kontrolliert, ob dieser bereits präsent war, ob er neu entstanden war oder ob bereits vorhandene Spines verloren gegangen waren. Als identisch wurden Spines dabei betrachtet, wenn sich ihre Position entlang des Dendriten um nicht mehr als einen Mikrometer verändert hatte. Die Länge des entsprechenden Dendritenabschnitts wurde ebenfalls im Raum bestimmt. Die Daten wurden in Excel-Tabellen erfasst und teilweise mit selbstangefertigten Routinen ausgewertet.

Die Klassifizierung der dendritischen Spines nach ihrer Form wurde semiautomatisch mit der Software Imaris 5.0.1 (Bitplane) durchgeführt. Es wurden laterale Spines in diesem Programm markiert und anhand der automatisch ermittelten Parameter Spinelänge (L_{spine}), Breite des Spinekopfes (W_{head}) und Breite des Spinehalses (W_{neck}) die dendritischen Spines nach den folgenden Regeln hierarchisch klassifiziert (Harris *et al.*, 1992): *mushroom*-Spines: (maximaler W_{head})/(minimaler W_{neck}) > 1,4 und (maximaler W_{head}) > 0,5µm und (minimaler W_{neck}) > 0µm; *stubby*-Spines: (L_{spine})/(mittlerer W_{neck}) < 3 oder (minimaler W_{neck}) = 0µm oder (minimaler W_{neck}) > 0,5µm; *thin*-Spines: (L_{spine})/(mittlerer W_{neck}) > 3.

Zu Abbildungszwecken wurden Bilddateien dekonvolviert (AutoQuantX2, Media Cybernetics), um den Kontrast zu verbessern, das Hintergrundsignal zu reduzieren und die Kanten von Detailen zu schärfen (Holmes, 1988). Der Einfluss dieser Bildbearbeitung wurde in Abbildung 29E und F verdeutlicht. Mit Photoshop (Adobe) wurden die Einzelbilder auf ihre Größe zugeschnitten, vereinzelt die Signale störender weiterer Dendriten entfernt und die Bilder invertiert.

6.5.2 Statistische Auswertung

Die Prüfung statistischer Signifikanzen wurde mit den Programmen SigmaPlot (Systat Software) und Prism5 (GraphPad) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Experimentgruppen wurde der T-Test verwendet. Bei mehreren Experimentgruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (1way ANOVA) eingesetzt. Der Vergleich eines Parameters zweier Gruppen über mehrere Zeitpunkte erfolgte mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (2way ANOVA) mit anschließender Benferroni Testung der Einzelwerte. Für den charakteristischen Verlauf der Spine-Dynamiken bei der Evaluierung des BACE1-Inhibitors wurden die Anstiege der jeweiligen linearen Regression über

den angezeigten Zeitraum statistisch verglichen (als kleine Graphen jeweils recht oben). Die Daten sind als Mittelwert angegeben und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittels (*standard error of the mean*, SEM) dar. Unterschiede wurden als signifikant erachtet, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$).

6.6 Standard-Labormaterialien und Lösungen

Material	Details	Firma
Acrylamid Rotiphorese Gel 30		Roth
Agar		Roth
Agarose		Serva
Ammoniumpersulfat		Merck
Ampicilin		Merck
Blotpapier		Whatman
		Schleicher&Schuell
Blotpuffer (<i>semidry</i>)		
• Tris	25mM	
• Glycin	192mM	
• SDS	0,04%	
• Methanol	20%	
	pH 8,3	
Blotpuffer (<i>wet</i>)		
• Tris	50mM	
• Glycin	40mM	
• SDS	0,04%	
• Methanol	10%	
	pH 8,3	
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)		Sigma
Bromphenolblau		Merck
Deckgläschen		VWR
Dithioerythrit (DTE)		Roth
DMEM		Gibco
DNA-Ladepuffer		Sigma
DNA-Standard		
• 100bp-ladder		Peqlab
• 1kb-ladder		New England Biolabs
EDTA		Merck
Einwegpipetten (5ml/10ml/25ml)		Greiner bio-one
Einwegpipetten (1ml)		VWR
Essigsäure		Roth
Ethanol		VWR
Ethidiumbromid		Roth
Falcontubes (10ml/50ml)		Greiner bio-one
fetales Kälberserum		Pan Biotech
Ficoll400		Amersham
Flügelkanüle		Hospira venisystems
Glukose		Roth
Glycin		Roth
Glycerin		Merck
HBSS		Gibco
Hefeextrakt		Roth
Hepes		Roth
Hydroxypropyl- β -cyclodextrin		Sigma
Immersionsöl		Zeiss
Incidin		Ecolah
isotone Kochsalz-Lösung		Braun
Kaliumacetat		Merck
Kaliumchlorid		Merck
Kalziumchlorid		Merck
Kaliumdihydrogenphosphat		Merck
Kanülen (27G/20G)		Terumo

Material	Details	Firma
LB-Agarplatten		
• Agar	15g/l	
• in LB-Medium		
LB-Medium		
• Trypton	10g/l	
• Hefeextrakt	5g/l	
• Natriumchlorid	85mM	
LösungI _{Miniprep}		
• Glucose	50mM	
• Tris	25mM	
• EDTA	10mM	
• RNase	0,1mg/ml	
LösungII _{Miniprep}		
• Natriumhydroxid	200mM	
• SDS	1%	
LösungIII _{Miniprep}		
• Kaliumacetat	3M	
• Essigsäure	11,50%	
	pH 5,2	
LösungI _{Synprep}		
• Sucrose	320mM	
• Hepes	5mM	
• PMSF	2µM	
• MPIC	1 Tablette / 10ml	
	pH 7,4	
LösungII _{Synprep}		
• Glucose	10mM	
• Kaliumchlorid	5mM	
• Natriumchlorid	140mM	
• Natriumhydrogencarbonat	5mM	
• Magnesiumchlorid	1mM	
• Natriumdihydrogenphosphat	1,2mM	
• Hepes	20mM	
	pH 7,4	
Magnesiumchlorid		Merck
Mercaptoethanol		Merck
Methanol		Merck
Methansulfonsäure		Merck
Milchpulver		Roth
MPIC (Mini Protease Inhibitor Cocktail)		Roche
Natriumchlorid		Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)		Sigma
Natriumdihydrogenphosphat		Merck
Natriumhydrogencarbonat		Merck
Natriumhydrogenphosphat		Merck
Natriumhydroxid		Merck
Natriumazid		Roth
Objektträger		ThermoScientific
Paraformaldehyd (PFA)		Roth
Pasteurpipetten		Hartenstein
PBS (steril)		Pan Biotech
PBS (10x)		
• Natriumchlorid	1,4M	
• Kaliumchlorid	27mM	
• Natriumhydrogenphosphat	10mM	
	18mM	
• Kaliumdihydrogenphosphat		

Material	Details	Firma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)		Merck Millipore
Poly-L-Lysin		Sigma
ProteinaseK		Peqlab
Proteinmarker		
• MagicMark XP Protein Standard		Invitrogen
• Himark prestained		Invitrogen
Rasierklingen		Rotbart
Reaktionsgefäße		Eppendorf
RNase		Peqlab
Schraubeppendorfgefäße (1,5ml)		Sarstedt
Salzsäure		Roth
SDS-Gel Laufpuffer (10x)		
• Tris	25mM	
• Glycin	1,9M	
• SDS	35mM	
SDS-Gelladepuffer (2x)		
• Tris-HCL	120mM	
• Glycerol	20%	
• SDS	4%	
• DTE	200mM	
• Bromphenolblau	0,05%	
Skalpelle		Swann Morton
Spritzen		Terumo
Sterilfilter		Whatman
		Schleicher&Schuell
Sucrose		Sigma
Sybr-Gold		Life Technologies
TAE (50x)		
• Tris	2M	
• EDTA	64mM	
• Essigsäure	6%	
TEMED		Roth
Tris		Roth
Tris-HCl		Gibco
Triton X-100		Sigma
Trypton		Roth
Tween20		Sigma
Westernblot Detektionspuffer		
• Natriumchlorid	100mM	
• Magnesiumchlorid	5mM	
• Tris	100mM	
	pH 9,5	
Westernblot Blocklösung		
• Milchpulver	5%	
• Tris	20mM	
• Natriumchlorid	150mM	
• Tween20	0,10%	
Westernblot Striplösung		
• Tris	50mM	
• SDS	2%	
• Mercaptoethanol	0,80%	
Zellkulturflaschen		Nunc
Zellkulturplatten (10cm/15cm)		Sigma
Zellkulturplatten (12 well)		Nunc

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AICD	(<i>APP intracellular domain</i>) intrazelluläre Domäne des APP
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
angep.	angepasst
ANOVA	(<i>analysis of variance</i>) Varianzanalyse
AOM	akustooptischen Modulator
Aph-1	<i>anterior pharynx-defective phenotype</i>
APLP1 / APLP2	<i>amyloid precursor like protein1/2</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	(<i>amyloid precursor protein</i>) Amyloid-Vorläuferproteins
APPsα/β	(<i>soluble</i>) lösliches APPα/β
Aβ	Amyloidβ
BACE1/2	(<i>β-site APP cleaving enzyme1/2</i>) APP spaltendes Enzym an der
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
Blr1	Burkitt-Lymphom-Rezeptor 1
Ca ²⁺	Calcium (-Ionen)
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasell
cm	Zentimeter
CP	<i>crossing point</i>
CTF	C-terminales Fragment
CX3CR1	Fraktalkin-Rezeptor1
d	(<i>day</i>) Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EE	<i>Enriched Environment</i>

EGFP	(<i>enhanced green fluorescent protein</i>) verstärktes grün-
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FAD	(<i>familial Alzheimer's disease</i>) familiäre Form der Alzheimerschen
FTLD	(<i>frontotemporal lobar degeneration</i>) Frontotemporalen Demenz
g	Gramm
GaAsP	Galliumarsenidphosphid
GFP	(<i>green fluorescent protein</i>) grün-fluoreszierendes Protein
GRIN	<i>gradient refractive index</i>
HC	Hippocampus
hPS1	humanes Wildtyp-PS1
HP β CD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
IP3-R	Inositol-3-Phosphat Rezeptor
IVC	(<i>individual ventilated cage</i>) individuell belüfteter Käfig
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
ko	<i>knockout</i>
KTX	Kortex
LRP1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
L _{Spine}	(<i>spine length</i>) Spinelänge
LTD	(<i>long-term depression</i>) Langzeit-Depression
LTP	(<i>long-term potentiation</i>) Langzeit-Potentierung
LV	Lentivirus / lentiviral
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	(<i>messenger</i>) Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NICD	(<i>Notch intracellular domain</i>) intrazelluläre Domäne von Notch
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NMDA	N-Methy-D-Aspartat
NRG1	Neuregulin1
NT-3	<i>neurotrophin-3</i>

NTF	N-terminales Fragment
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen-2	<i>presenilin enhancer</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMT	(<i>photomultiplier tube</i>) Photomultiplier
PS1/2	Präsenilin1/2
PSD	(<i>postsynaptic density</i>) Postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rel.	relativ
RFP	(<i>red fluorescent protein</i>) rot-fluoreszierendes Protein
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunden
SEM	(<i>standard error of the mean</i>) Standardfehler des Mittels
SERCA	Sarco-/Enplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase
SPF	spezifiziert pathogenfrei
T	Temperatur
t	(<i>time</i>) Zeit
Ti:Saphir	Titan:Saphir
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Licht im ultravioletten Bereich
W_{head}	(<i>spine head width</i>) Breite des Spinekopfes
W_{neck}	(<i>spine neck width</i>) Breite des Spinehalses
WT	Wildtyp
XFP	"farbvariabel"-fluoreszierendes Protein
YFP	(<i>yellow fluorescent protein</i>) gelb-fluoreszierendes Protein

8 Literaturverzeichnis

- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G.D., Ruff, E., und Slutsky, I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12, 1567-1576.
- Allinson, T.M., Parkin, E.T., Turner, A.J., und Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, 342-352.
- Altman, J., und Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr* 64, 146-148.
- Aronoff, R., Matyas, F., Mateo, C., Ciron, C., Schneider, B., und Petersen, C.C. (2010). Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex. *Eur J Neurosci* 31, 2221-2233.
- Atwal, J.K., Chen, Y., Chiu, C., Mortensen, D.L., Meilandt, W.J., Liu, Y., Heise, C.E., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., *et al.* (2011). A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid-beta production in vivo. *Sci Transl Med* 3, 84ra43.
- Auffret, A., Gautheron, V., Mattson, M.P., Mariani, J., und Rovira, C. (2010). Progressive age-related impairment of the late long-term potentiation in Alzheimer's disease presenilin-1 mutant knock-in mice. *J Alzheimers Dis* 19, 1021-1033.
- Auffret, A., Gautheron, V., Repici, M., Kraftsik, R., Mount, H.T., Mariani, J., und Rovira, C. (2009). Age-dependent impairment of spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of a presenilin 1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29, 10144-10152.
- Bailey, C.H., und Chen, M. (1988). Long-term memory in *Aplysia* modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2373-2377.
- Bailey, C.H., und Chen, M. (1989). Time course of structural changes at identified sensory neuron synapses during long-term sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* 9, 1774-1780.
- Barretto, R.P., Messerschmidt, B., und Schnitzer, M.J. (2009). In vivo fluorescence imaging with high-resolution microlenses. *Nat Methods* 6, 511-512.
- Barros, C.S., Calabrese, B., Chamero, P., Roberts, A.J., Korzus, E., Lloyd, K., Stowers, L., Mayford, M., Halpain, S., und Muller, U. (2009). Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4507-4512.
- Barrow, P.A., Empson, R.M., Gladwell, S.J., Anderson, C.M., Killick, R., Yu, X., Jefferys, J.G., und Duff, K. (2000). Functional phenotype in transgenic mice expressing mutant human presenilin-1. *Neurobiol Dis* 7, 119-126.
- Batelli, S., Albani, D., Prato, F., Polito, L., Franceschi, M., Gavazzi, A., und Forloni, G. (2008). Early-onset Alzheimer disease in an Italian family with presenilin-1 double mutation E318G and G394V. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 22, 184-187.
- Becker, N., Wierenga, C.J., Fonseca, R., Bonhoeffer, T., und Nagerl, U.V. (2008). LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron* 60, 590-597.
- Bennett, E.L., Rosenzweig, M.R., und Diamond, M.C. (1969). Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Science* 163, 825-826.

- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horre, K., Wiltfang, J., Esselmann, H., und De Strooper, B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96, 732-742.
- Bernstein, L. (1973). A study of some enriching variables in a free-environment for rats. *J Psychosom Res* 17, 85-88.
- Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Piazza, P.V., Gross, C.E., und Jaber, M. (2003). Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci* 23, 10999-11007.
- Bezprozvanny, I., und Mattson, M.P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 31, 454-463.
- Bhatt, D.H., Zhang, S., und Gan, W.B. (2009). Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol* 71, 261-282.
- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Jung, C.K., Volbracht, C., Steiner, H., Mitteregger, G., Kretschmar, H.A., Haass, C., und Herms, J. (2009). Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci* 29, 10405-10409.
- Bliss, T.V., und Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., *et al.* (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005-1013.
- Bourne, J., und Harris, K.M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17, 381-386.
- Braak, H., und Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
- Burgold, S., Bittner, T., Dorostkar, M.M., Kieser, D., Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretschmar, H., Schmidt, B., und Herms, J. (2011). In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta Neuropathol* 121, 327-335.
- Busciglio, J., Gabuzda, D.H., Matsudaira, P., und Yankner, B.A. (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2092-2096.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., und Wong, P.C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4, 233-234.
- Calabrese, B., Wilson, M.S., und Halpain, S. (2006). Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)* 21, 38-47.
- Cash, S., und Yuste, R. (1998). Input summation by cultured pyramidal neurons is linear and position-independent. *J Neurosci* 18, 10-15.
- Cetin, A., Komai, S., Eliava, M., Seeburg, P.H., und Osten, P. (2006). Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1, 3166-3173.
- Chakroborty, S., Goussakov, I., Miller, M.B., und Stutzmann, G.E. (2009). Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice. *J Neurosci* 29, 9458-9470.
- Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., Hardy, J., *et al.* (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353, 844-846.
- Cheung, K.H., Mei, L., Mak, D.O., Hayashi, I., Iwatsubo, T., Kang, D.E., und Foscett, J.K. (2010). Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Sci Signal* 3, ra22.
- Cheung, K.H., Shineman, D., Muller, M., Cardenas, C., Mei, L., Yang, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Lee, V.M., und Foscett, J.K. (2008). Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* 58, 871-883.
- Chklovskii, D.B., Mel, B.W., und Svoboda, K. (2004). Cortical rewiring and information storage. *Nature* 431, 782-788.
- Chklovskii, D.B., Schikorski, T., und Stevens, C.F. (2002). Wiring optimization in cortical circuits. *Neuron* 34, 341-347.

- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., und Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8, 79-84.
- Comery, T.A., Shah, R., und Greenough, W.T. (1995). Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 63, 217-219.
- Cronin, J., Zhang, X.Y., und Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther* 5, 387-398.
- Cybulska-Klosowicz, A., und Kossut, M. (2001). Mice can learn roughness discrimination with vibrissae in a jump stand apparatus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 61, 73-76.
- Dailey, M.E., und Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16, 2983-2994.
- Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., und Yates, P.O. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78, 151-164.
- De Paola, V., Holtmaat, A., Knott, G., Song, S., Wilbrecht, L., Caroni, P., und Svoboda, K. (2006). Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron* 49, 861-875.
- De Roo, M., Klauser, P., Mendez, P., Poglia, L., und Muller, D. (2008). Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb Cortex* 18, 151-161.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., und Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.
- De Strooper, B., Vassar, R., und Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 99-107.
- DeKosky, S.T., und Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457-464.
- Denk, W., Strickler, J.H., und Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.
- Dewachter, I., Ris, L., Croes, S., Borghgraef, P., Devijver, H., Voets, T., Nilius, B., Godaux, E., und Van Leuven, F. (2008). Modulation of synaptic plasticity and Tau phosphorylation by wild-type and mutant presenilin1. *Neurobiol Aging* 29, 639-652.
- Dewachter, I., Van Dorpe, J., Smeijers, L., Gilis, M., Kuiperi, C., Laenen, I., Caluwaerts, N., Moechars, D., Checler, F., Vanderstichele, H., *et al.* (2000). Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* 20, 6452-6458.
- Dislich, B., und Lichtenthaler, S.F. (2012). The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol* 3, 8.
- Dittgen, T., Nimmerjahn, A., Komai, S., Licznarski, P., Waters, J., Margrie, T.W., Helmchen, F., Denk, W., Brecht, M., und Osten, P. (2004). Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18206-18211.
- Dombeck, D.A., Khabbaz, A.N., Collman, F., Adelman, T.L., und Tank, D.W. (2007). Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron* 56, 43-57.
- Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I.E., Marjaux, E., Craessaerts, K., *et al.* (2005). Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem* 280, 30797-30806.
- Draganski, B., Gaser, C., Busch, V., Schuierer, G., Bogdahn, U., und May, A. (2004). Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. *Nature* 427, 311-312.
- Drew, P.J., Shih, A.Y., Driscoll, J.D., Knutsen, P.M., Blinder, P., Davalos, D., Akassoglou, K., Tsai, P.S., und Kleinfeld, D. (2010). Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat Methods* 7, 981-984.

- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., *et al.* (1996). Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710-713.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., und Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., De Gasperi, R., Dickstein, D.L., und Hof, P.R. (2010). Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214, 127-143.
- Engert, F., und Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., und Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., und Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51.
- Feng, R., Rampon, C., Tang, Y.P., Shrom, D., Jin, J., Kyin, M., Sopher, B., Miller, M.W., Ware, C.B., Martin, G.M., *et al.* (2001). Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32, 911-926.
- Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., *et al.* (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., und Tsai, L.H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178-182.
- Fu, M., Yu, X., Lu, J., und Zuo, Y. (2012). Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature* 483, 92-95.
- Fu, M., und Zuo, Y. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci* 34, 177-187.
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C.K., Burgold, S., Page, R.M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F.M., Kretschmar, H., und Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13, 411-413.
- Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretschmar, H., und Herms, J. (2007). Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci* 27, 6224-6233.
- Fukamoto, H., Takahashi, H., Tarui, N., Matsui, J., Tomita, T., Hirode, M., Sagayama, M., Maeda, R., Kawamoto, M., Hirai, K., *et al.* (2010). A noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates Abeta pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30, 11157-11166.
- Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S.W., Allinquant, B., Muller, U., und Ciccolini, F. (2008). Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur J Neurosci* 28, 871-882.
- Garaschuk, O., Milos, R.I., und Konnerth, A. (2006). Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat Protoc* 1, 380-386.
- Gelfo, F., De Bartolo, P., Giovine, A., Petrosini, L., und Leggio, M.G. (2009). Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 91, 353-365.
- Glennner, G.G., und Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., *et al.* (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., und Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41, 17-24.
- Goussakov, I., Miller, M.B., und Stutzmann, G.E. (2010). NMDA-mediated Ca²⁺ influx drives aberrant ryanodine receptor activation in dendrites of young Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 30, 12128-12137.
- Graeber, M.B. (1999). No man alone: the rediscovery of Alois Alzheimer's original cases. *Brain Pathol* 9, 237-240.

- Green, K.N., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B.D., Smith, I.F., Parker, I., and LaFerla, F.M. (2008). SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J Cell Biol* 181, 1107-1116.
- Greenough, W.T., Volkmar, F.R., and Juraska, J.M. (1973). Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol* 41, 371-378.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., and Gan, W.B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812-816.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B., *et al.* (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039-1042.
- Hardy, J., and Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383-388.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12, 2685-2705.
- Hebb, D.O. (1947). The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am Psychol* 2, 306-307.
- Hebb, D.O. (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory* (New York, Wiley).
- Heilig, E.A., Xia, W., Shen, J., and Kelleher, R.J., 3rd (2010). A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 285, 22350-22359.
- Hellstrom-Lindahl, E., Viitanen, M., and Marutle, A. (2009). Comparison of Abeta levels in the brain of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 55, 243-252.
- Helmchen, F., and Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2, 932-940.
- Helmchen, F., Svoboda, K., Denk, W., and Tank, D.W. (1999). In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2, 989-996.
- Hemming, M.L., Elias, J.E., Gygi, S.P., and Selkoe, D.J. (2009). Identification of beta-secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One* 4, e8477.
- Hitt, B.D., Jaramillo, T.C., Chetkovich, D.M., and Vassar, R. (2010). BACE1^{-/-} mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol Neurodegener* 5, 31.
- Ho, V.M., Lee, J.A., and Martin, K.C. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. *Science* 334, 623-628.
- Hoe, H.S., Fu, Z., Makarova, A., Lee, J.Y., Lu, C., Feng, L., Pajoohesh-Ganji, A., Matsuoka, Y., Hyman, B.T., Ehlers, M.D., *et al.* (2009). The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *J Biol Chem* 284, 8495-8506.
- Hoe, H.S., Lee, H.K., and Pak, D.T. (2012). The upside of APP at synapses. *CNS Neurosci Ther* 18, 47-56.
- Hofer, S.B., Mrsic-Flogel, T.D., Bonhoeffer, T., and Hubener, M. (2009). Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* 457, 313-317.
- Holmes, T.J. (1988). Maximum-Likelihood Image-Restoration Adapted for Noncoherent Optical Imaging. *J Opt Soc Am A* 5, 666-673.
- Holthoff, K., Tsay, D., and Yuste, R. (2002). Calcium dynamics of spines depend on their dendritic location. *Neuron* 33, 425-437.
- Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D.K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S.B., Hubener, M., Keck, T., Knott, G., Lee, W.C., *et al.* (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc* 4, 1128-1144.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G.W., Welker, E., and Svoboda, K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441, 979-983.
- Holtmaat, A.J., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., and Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279-291.

- Holtzman, D.M., Morris, J.C., und Goate, A.M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3, 77sr71.
- Hotulainen, P., und Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189, 619-629.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., und Malinow, R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831-843.
- Hu, X., Hicks, C.W., He, W., Wong, P., Macklin, W.B., Trapp, B.D., und Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9, 1520-1525.
- Hu, X., Zhou, X., He, W., Yang, J., Xiong, W., Wong, P., Wilson, C.G., und Yan, R. (2010). BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *J Neurosci* 30, 8819-8829.
- Hubel, D.H., und Wiesel, T.N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 206, 419-436.
- Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., und Doms, R.W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275, 33729-33737.
- Hussain, I., Hawkins, J., Harrison, D., Hille, C., Wayne, G., Cutler, L., Buck, T., Walter, D., Demont, E., Howes, C., *et al.* (2007). Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo. *J Neurochem* 100, 802-809.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., *et al.* (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419-427.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., *et al.* (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.
- Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., und Granholm, A.C. (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* 164, 45-52.
- Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., Matsui, C., Arita, K., Katahira-Tayama, S., Sato, T., Yamauchi, E., Oda, Y., und Takai, Y. (2009). Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *J Cell Biol* 185, 551-564.
- Ito, E., Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T.J., McPhie, D.L., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., und Alkon, D.L. (1994). Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 534-538.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., *et al.* (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387-397.
- Ivy, G.O., Akers, R.M., und Killackey, H.P. (1979). Differential distribution of callosal projection neurons in the neonatal and adult rat. *Brain Res* 173, 532-537.
- Jack, C.R., Jr., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., und Trojanowski, J.Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9, 119-128.
- Jakobsson, J., und Lundberg, C. (2006). Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Mol Ther* 13, 484-493.
- Jankowsky, J.L., Younkin, L.H., Gonzales, V., Fadale, D.J., Slunt, H.H., Lester, H.A., Younkin, S.G., und Borchelt, D.R. (2007). Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* 282, 22707-22720.
- Jung, C.K., und Herms, J. (2012). Role of APP for dendritic spine formation and stability. *Exp Brain Res* 217, 463-470.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., und Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.
- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.

- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., und Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Karran, E., Mercken, M., und De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10, 698-712.
- Katz, L.C., und Shatz, C.J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274, 1133-1138.
- Keck, T., Mrcic-Flogel, T.D., Vaz Afonso, M., Eysel, U.T., Bonhoeffer, T., und Hubener, M. (2008). Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat Neurosci* 11, 1162-1167.
- Keck, T., Scheuss, V., Jacobsen, R.I., Wierenga, C.J., Eysel, U.T., Bonhoeffer, T., und Hubener, M. (2011). Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex. *Neuron* 71, 869-882.
- Kelliher, M., Fastbom, J., Cowburn, R.F., Bonkale, W., Ohm, T.G., Ravid, R., Sorrentino, V., und O'Neill, C. (1999). Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience* 92, 499-513.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., und Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Kim, J., Basak, J.M., und Holtzman, D.M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303.
- Kitanishi, T., Ikegaya, Y., Matsuki, N., und Yamada, M.K. (2009). Experience-dependent, rapid structural changes in hippocampal pyramidal cell spines. *Cereb Cortex* 19, 2572-2578.
- Kleinfeld, D., Mitra, P.P., Helmchen, F., und Denk, W. (1998). Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15741-15746.
- Knott, G.W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., und Svoboda, K. (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9, 1117-1124.
- Koffie, R.M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K.W., Mielke, M.L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K.D., Smith, S.J., Kim, M.L., Lee, V.M., *et al.* (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *P Natl Acad Sci USA* 106, 4012-4017.
- Kolb, B., und Gibb, R. (1991). Environmental enrichment and cortical injury: behavioral and anatomical consequences of frontal cortex lesions. *Cereb Cortex* 1, 189-198.
- Kolb, B., Gorny, G., Soderpalm, A.H., und Robinson, T.E. (2003). Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse* 48, 149-153.
- Kovacs, D.M., Gersbacher, M.T., und Kim, D.Y. (2010). Alzheimer's secretases regulate voltage-gated sodium channels. *Neurosci Lett* 486, 68-72.
- Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., Kopil, C., Battaglia, L., McBreen, M., Stranahan, A.M., und Gould, E. (2005). Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17478-17482.
- Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., und Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020-3032.
- Kumar, V.B., Franko, M., Banks, W.A., Kasinadhuni, P., Farr, S.A., Vyas, K., Choudhuri, V., und Morley, J.E. (2009). Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence-accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing. *J Exp Biol* 212, 494-498.
- Kummer, M.P., Hermes, M., Delekarte, A., Hammerschmidt, T., Kumar, S., Terwel, D., Walter, J., Pape, H.C., Konig, S., Roeber, S., *et al.* (2011). Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron* 71, 833-844.
- LaFerla, F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3, 862-872.
- Lai, C.S., Franke, T.F., und Gan, W.B. (2012). Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. *Nature* 483, 87-91.

- Laird, F.M., Cai, H., Savonenko, A.V., Farah, M.H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H.C., Xu, G., Koliatsos, V.E., *et al.* (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25, 11693-11709.
- Lashley, K.S. (1950). In Search of the Engram. *Sym Soc Exp Biol* 4, 454-482.
- Laudon, H., Hansson, E.M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Naslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280, 35352-35360.
- LaVoie, M.J., Fraering, P.C., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Kimberly, W.T., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278, 37213-37222.
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K., and Sisodia, S.S. (2005). Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120, 701-713.
- Lee, E.H., Hsu, W.L., Ma, Y.L., Lee, P.J., and Chao, C.C. (2003). Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci* 18, 2842-2852.
- Lee, J.H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., *et al.* (2010c). Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell* 141, 1146-U1191.
- Lee, K.J., Moussa, C.E., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B.W., Turner, R.S., Pak, D.T., and Hoe, H.S. (2010a). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* 169, 344-356.
- Lee, Y., Back, J.H., Kim, J., Kim, S.H., Na, D.L., Cheong, H.K., Hong, C.H., and Kim, Y.G. (2010b). Systematic review of health behavioral risks and cognitive health in older adults. *Int Psychogeriatr* 22, 174-187.
- Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., and Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* 163, 78-90.
- Lendvai, B., Stern, E.A., Chen, B., and Svoboda, K. (2000). Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404, 876-881.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., *et al.* (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.
- Li, Z.W., Stark, G., Gotz, J., Rulicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Muller, U., and Weissmann, C. (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6158-6162.
- Lichtenthaler, S.F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S.N., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1999). Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3053-3058.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456-1460.
- Locke, J. (1690). *An Essay Concerning Human Understanding*, Vol II.
- Loffler, J., and Huber, G. (1992). Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J Neurochem* 59, 1316-1324.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., and Rogers, J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155, 853-862.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., *et al.* (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4, 231-232.

- Majewska, A.K., Newton, J.R., und Sur, M. (2006). Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *J Neurosci* 26, 3021-3029.
- Malamas, M.S., Robichaud, A., Erdei, J., Quagliato, D., Solvibile, W., Zhou, P., Morris, K., Turner, J., Wagner, E., Fan, K., *et al.* (2010). Design and synthesis of aminohydantoin as potent and selective human beta-secretase (BACE1) inhibitors with enhanced brain permeability. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 6597-6605.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., und Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.
- Mandybur, T.I. (1975). The incidence of cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Neurology* 25, 120-126.
- Marik, S.A., Yamahachi, H., McManus, J.N., Szabo, G., und Gilbert, C.D. (2010). Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. *PLoS Biol* 8, e1000395.
- Marrs, G.S., Green, S.H., und Dailey, M.E. (2001). Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* 4, 1006-1013.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., und Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4, 1086-1092.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., und Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- May, P.C., Dean, R.A., Lowe, S.L., Martenyi, F., Sheehan, S.M., Boggs, L.N., Monk, S.A., Mathes, B.M., Mergott, D.J., Watson, B.M., *et al.* (2011). Robust central reduction of amyloid-beta in humans with an orally available, non-peptidic beta-secretase inhibitor. *J Neurosci* 31, 16507-16516.
- McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J.P., Brigham, E.F., Chen, K.S., Freedman, S.B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., *et al.* (2007). Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem* 282, 26326-26334.
- McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., *et al.* (2005). Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47, 191-199.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., und Masters, C.L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46, 860-866.
- Meyer-Luehmann, M., Mielke, M., Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W., Jones, P., Bacskaï, B.J., und Hyman, B.T. (2009). A reporter of local dendritic translocation shows plaque-related loss of neural system function in APP-transgenic mice. *J Neurosci* 29, 12636-12640.
- Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M., und Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12683-12688.
- Miller, J.A., Oldham, M.C., und Geschwind, D.H. (2008). A systems level analysis of transcriptional changes in Alzheimer's disease and normal aging. *J Neurosci* 28, 1410-1420.
- Mizrahi, A. (2007). Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10, 444-452.
- Mizrahi, A., Crowley, J.C., Shtoyerman, E., und Katz, L.C. (2004). High-resolution in vivo imaging of hippocampal dendrites and spines. *J Neurosci* 24, 3147-3151.
- Mizrahi, A., und Katz, L.C. (2003). Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6, 1201-1207.
- Murayama, O., Tomita, T., Nihonmatsu, N., Murayama, M., Sun, X., Honda, T., Iwatsubo, T., und Takashima, A. (1999). Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 265, 61-63.
- Mysore, S.P., Tai, C.Y., und Schuman, E.M. (2007). Effects of N-cadherin disruption on spine morphological dynamics. *Front Cell Neurosci* 1, 1.
- Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., und Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44, 759-767.
- Nägerl, U.V., Kostinger, G., Anderson, J.C., Martin, K.A., und Bonhoeffer, T. (2007). Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 27, 8149-8156.
- Newpher, T.M., und Ehlers, M.D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19, 218-227.

- Nicholls, D.G. (1978). Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem J* 170, 511-522.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N., und Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1, 31-37.
- Nussbaum, J.M., Schilling, S., Cynis, H., Silva, A., Swanson, E., Wangsanut, T., Tayler, K., Wiltgen, B., Hatami, A., Ronicke, R., *et al.* (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta. *Nature* 485, 651-655.
- O'Brien, R.J., und Wong, P.C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34, 185-204.
- Ohno, M., Sametsky, E.A., Younkin, L.H., Oakley, H., Younkin, S.G., Citron, M., Vassar, R., und Disterhoft, J.F. (2004). BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 41, 27-33.
- Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., und Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7, 1104-1112.
- Ostroff, L.E., Fiala, J.C., Allwardt, B., und Harris, K.M. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35, 535-545.
- Parent, A., Linden, D.J., Sisodia, S.S., und Borchelt, D.R. (1999). Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in transgenic mice expressing FAD-linked presenilin 1. *Neurobiol Dis* 6, 56-62.
- Perez-Otano, I., und Ehlers, M.D. (2005). Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28, 229-238.
- Peters, A., und Kaiserman-Abramof, I.R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127, 321-355.
- Petreanu, L., Huber, D., Sobczyk, A., und Svoboda, K. (2007). Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* 10, 663-668.
- Phinney, A.L., Calhoun, M.E., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Zheng, H., und Jucker, M. (1999). No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged beta-amyloid precursor protein-null mice. *Neuroscience* 90, 1207-1216.
- Pimplikar, S.W., Nixon, R.A., Robakis, N.K., Shen, J., und Tsai, L.H. (2010). Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 30, 14946-14954.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H.A., und Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212-7221.
- Prince, M., Bryce, R., und Ferri, C. (2011). World Alzheimer Report 2011. Alzheimer's Disease International.
- Prokop, S., Shirotani, K., Edbauer, D., Haass, C., und Steiner, H. (2004). Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the gamma-secretase complex. *J Biol Chem* 279, 23255-23261.
- Ramón y Cajal, S. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Patol* 1, 1-10.
- Ramón y Cajal, S. (1893). Neue Darstellung vom histologischen Bau des Centralnervensystems. *Arch Anat Physiol* 17, 9-428.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyn, M., und Tsien, J.Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3, 238-244.
- Reiman, E.M., Chen, K., Liu, X., Bandy, D., Yu, M., Lee, W., Ayutyanont, N., Keppler, J., Reeder, S.A., Langbaum, J.B., *et al.* (2009). Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6820-6825.
- Rema, V., Armstrong-James, M., Jenkinson, N., und Ebner, F.F. (2006). Short exposure to an enriched environment accelerates plasticity in the barrel cortex of adult rats. *Neuroscience* 140, 659-672.
- Ribaut-Barassin, C., Dupont, J.L., Haeberle, A.M., Bombarde, G., Huber, G., Moussaoui, S., Mariani, J., und Bailly, Y. (2003). Alzheimer's disease proteins in cerebellar and hippocampal synapses during postnatal development and aging of the rat. *Neuroscience* 120, 405-423.
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., *et al.* (2001). BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10, 1317-1324.

- Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.Q., *et al.* (2011). Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31, 700-711.
- Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., und Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750-754.
- Rosenzweig, M.R. (1966). Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am Psychol* 21, 321-332.
- Rosenzweig, M.R., Krech, D., Bennett, E.L., und Diamond, M.C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 55, 429-437.
- Sankaranarayanan, S., Holahan, M.A., Colussi, D., Crouthamel, M.C., Devanarayan, V., Ellis, J., Espeseth, A., Gates, A.T., Graham, S.L., Gregro, A.R., *et al.* (2009). First demonstration of cerebrospinal fluid and plasma A beta lowering with oral administration of a beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 inhibitor in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 131-140.
- Sankaranarayanan, S., Price, E.A., Wu, G., Crouthamel, M.C., Shi, X.P., Tugusheva, K., Tyler, K.X., Kahana, J., Ellis, J., Jin, L., *et al.* (2008). In vivo beta-secretase 1 inhibition leads to brain Abeta lowering and increased alpha-secretase processing of amyloid precursor protein without effect on neuregulin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 957-969.
- Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munck, S., De Strooper, B., *et al.* (2011). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E559-568.
- Savonenko, A.V., Melnikova, T., Laird, F.M., Stewart, K.A., Price, D.L., und Wong, P.C. (2008). Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5585-5590.
- Savva, G.M., und Stephan, B.C. (2010). Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review. *Stroke* 41, e41-46.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., *et al.* (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.
- Schmidt, S., und Ehrlich, B.E. (2010). Unloading intracellular calcium stores reveals regionally specific functions. *Neuron* 68, 806-808.
- Schneider, I., Reverse, D., Dewachter, I., Ris, L., Caluwaerts, N., Kuiperi, C., Gilis, M., Geerts, H., Kretschmar, H., Godaux, E., *et al.* (2001). Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. *J Biol Chem* 276, 11539-11544.
- Schor, N.F. (2011). What the halted phase III gamma-secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann Neurol* 69, 237-239.
- Schrijver, N.C., Bahr, N.I., Weiss, I.C., und Wurbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 209-224.
- Scott, J.D., Li, S.W., Gilbert, E.J., Huang, C., Cumming J., Iserloh U., und Mazzola Jr R.D., B.S., Caldwell J., Chen X., Cox K., Czarniecki M., Durkin J., Favreau L., Guo T., Greenlee W.J., Hodgson R., Huang Y., Hyde L., Jiang Q., Kennedy M., Kuvelkar R., Leach P., Li G., Madison V., McKittrick B., Miller M., Orth P., Pan J., Parker E., Pasetto P., Stamford A.W., Strickland C., Sun Z., Tadesse D., Voigt J., Wang L., Werner B., Wong J., Wu Y., Zhang L., Zhu Z. (2011). MEDI 36 - Novel Iminopyrimidinone beta-Secretase (BACE1) Inhibitors - P1 Thiophenes. 241st American Chemical Society National Meeting, Anaheim, CA.
- Seabrook, G.R., Smith, D.W., Bowery, B.J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Zheng, H., Dawson, G.R., Sirinathsingji, D.J., *et al.* (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38, 349-359.
- Segal, M. (2010a). Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur J Neurosci* 31, 2178-2184.
- Segal, M., Vlachos, A., und Korkotian, E. (2010b). The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neuroscientist* 16, 125-131.

- Selkoe, D., und Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-597.
- Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-498.
- Shah, S., Lee, S.F., Tabuchi, K., Hao, Y.H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., 3rd, Sudhof, T., und Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122, 435-447.
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., und Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27, 2866-2875.
- Sheng, J.G., Price, D.L., und Koliatsos, V.E. (2003). The beta-amyloid-related proteins presenilin 1 and BACE1 are axonally transported to nerve terminals in the brain. *Exp Neurol* 184, 1053-1057.
- Sheng, M., und Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76, 823-847.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shioi, J., Georgakopoulos, A., Mehta, P., Kouchi, Z., Litterst, C.M., Baki, L., und Robakis, N.K. (2007). FAD mutants unable to increase neurotoxic Abeta 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on Abeta. *J Neurochem* 101, 674-681.
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.D., McKay, D.M., Tintner, R., Frangione, B., *et al.* (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258, 126-129.
- Siegelbaum, S.A., und Kandel, E.R. (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1, 113-120.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., *et al.* (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537-540.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., und Price, D.L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495.
- Smith, I.F., Hitt, B., Green, K.N., Oddo, S., und LaFerla, F.M. (2005). Enhanced caffeine-induced Ca²⁺ release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 94, 1711-1718.
- Soffie, M., Hahn, K., Terao, E., und Eclancher, F. (1999). Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res* 101, 37-49.
- Spires, T.L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E.A., McLean, P.J., Skoch, J., Nguyen, P.T., Bacskai, B.J., und Hyman, B.T. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25, 7278-7287.
- Stepanyants, A., Hof, P.R., und Chklovskii, D.B. (2002). Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity. *Neuron* 34, 275-288.
- Stettler, D.D., Yamahachi, H., Li, W., Denk, W., und Gilbert, C.D. (2006). Axons and synaptic boutons are highly dynamic in adult visual cortex. *Neuron* 49, 877-887.
- Stieren, E., Werchan, W.P., El Ayadi, A., Li, F., und Boehning, D. (2010). FAD mutations in amyloid precursor protein do not directly perturb intracellular calcium homeostasis. *PLoS One* 5, e11992.
- Struhl, G., und Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6, 625-636.
- Stutzmann, G.E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Laferla, F.M., und Parker, I. (2006). Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca²⁺ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 26, 5180-5189.
- Sundstrom, A., Nilsson, L.G., Cruts, M., Adolfsson, R., Van Broeckhoven, C., und Nyberg, L. (2007). Increased risk of dementia following mild head injury for carriers but not for non-carriers of the APOE epsilon4 allele. *Int Psychogeriatr* 19, 159-165.
- Sütterlin, S., Hoßmann, I., und Klingholz, R. (2011). Demenz-Report 2011. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D., und Tank, D.W. (1997). In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature* 385, 161-165.

- Svoboda, K., und Yasuda, R. (2006). Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50, 823-839.
- Sztainberg, Y., und Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc* 5, 1535-1539.
- Tada, T., und Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16, 95-101.
- Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., und Tsien, J.Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779-790.
- Tanzi, R.E., und Bertram, L. (2001). New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32, 181-184.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., und Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30, 572-580.
- Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., *et al.* (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17, 181-190.
- Tiscornia, G., Singer, O., und Verma, I.M. (2006). Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 1, 241-245.
- Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., und Selkoe, D.J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572, 477-492.
- Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., und Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788-794.
- Tropea, D., Majewska, A.K., Garcia, R., und Sur, M. (2010). Structural dynamics of synapses in vivo correlate with functional changes during experience-dependent plasticity in visual cortex. *J Neurosci* 30, 11086-11095.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.F., Hao, Y.H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., und Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981-993.
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., und Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892-896.
- Valenzuela, M.J., und Sachdev, P. (2006). Brain reserve and dementia: a systematic review. *Psychol Med* 36, 441-454.
- van Brederode, J.F., Helliesen, M.K., und Hendrickson, A.E. (1991). Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat. *Neuroscience* 44, 157-171.
- van Praag, H., Kempermann, G., und Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1, 191-198.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., und Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., *et al.* (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Vassar, R., Gandy, S., und Ishiura, S. (2011). Alzheimer's therapy: a BACE in the hand? *Nat Med* 17, 932-933.
- Vassar, R., und Kandalepas, P.C. (2011). The beta-secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 3, 20.
- von Arnim, C.A., Kinoshita, A., Peltan, I.D., Tangredi, M.M., Herl, L., Lee, B.M., Spoelgen, R., Hsieh, T.T., Ranganathan, S., Battey, F.D., *et al.* (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280, 17777-17785.
- von Baumgarten, L., Brucker, D., Tirniceru, A., Kienast, Y., Grau, S., Burgold, S., Herms, J., und Winkler, F. (2011). Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells. *Clin Cancer Res* 17, 6192-6205.
- Wakabayashi, T., und De Strooper, B. (2008). Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)* 23, 194-204.
- Wallace, D.J., Meyer zum Alten Borgloh, S., Astori, S., Yang, Y., Bausen, M., Kugler, S., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., Sprengel, R., Kerr, J.N., *et al.* (2008). Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic Ca²⁺ sensor. *Nat Methods* 5, 797-804.

- Wang, J., Dickson, D.W., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 158, 328-337.
- Wang, P., Yang, G., Mosier, D.R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Dominguez, B., Lee, K.F., Gan, W.B., *et al.* (2005). Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci* 25, 1219-1225.
- Wang, Y., Greig, N.H., Yu, Q.S., and Mattson, M.P. (2009a). Presenilin-1 mutation impairs cholinergic modulation of synaptic plasticity and suppresses NMDA currents in hippocampus slices. *Neurobiol Aging* 30, 1061-1068.
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., and Zheng, H. (2009b). Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis. *J Neurosci* 29, 10788-10801.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758-10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., and Tanzi, R.E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5, 95-100.
- Wei, W., Nguyen, L.N., Kessels, H.W., Hagiwara, H., Sisodia, S., and Malinow, R. (2010). Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13, 190-196.
- Wilbrecht, L., Holtmaat, A., Wright, N., Fox, K., and Svoboda, K. (2010). Structural plasticity underlies experience-dependent functional plasticity of cortical circuits. *J Neurosci* 30, 4927-4932.
- Willem, M., Garratt, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., and Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314, 664-666.
- William, C.M., Andermann, M.L., Goldey, G.J., Roumis, D.K., Reid, R.C., Shatz, C.J., Albers, M.W., Frosch, M.P., and Hyman, B.T. (2012). Synaptic plasticity defect following visual deprivation in Alzheimer's disease model transgenic mice. *J Neurosci* 32, 8004-8011.
- Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., and Klug, A. (1988). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4506-4510.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-517.
- Wurzel, H. (2001). Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci* 24, 207-211.
- Xu, T., Yu, X., Perlik, A.J., Tobin, W.F., Zweig, J.A., Tennant, K., Jones, T., and Zuo, Y. (2009). Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 462, 915-919.
- Yamahachi, H., Marik, S.A., McManus, J.N., Denk, W., and Gilbert, C.D. (2009). Rapid axonal sprouting and pruning accompany functional reorganization in primary visual cortex. *Neuron* 64, 719-729.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., *et al.* (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533-537.
- Yang, G., Chang, P.C., Bekker, A., Blanck, T.J., and Gan, W.B. (2011). Transient effects of anesthetics on dendritic spines and filopodia in the living mouse cortex. *Anesthesiology* 115, 718-726.
- Yang, G., Pan, F., and Gan, W.B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462, 920-924.
- Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C.N., Grutzendler, J., and Gan, W.B. (2010). Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* 5, 201-208.
- Yu, H., Saura, C.A., Choi, S.Y., Sun, L.D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M.A., *et al.* (2001). APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron* 31, 713-726.
- Yuste, R. (2011). Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* 71, 772-781.
- Yuste, R., and Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684.

- Zaman, S.H., Parent, A., Laskey, A., Lee, M.K., Borchelt, D.R., Sisodia, S.S., und Malinow, R. (2000). Enhanced synaptic potentiation in transgenic mice expressing presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation is normalized with a benzodiazepine. *Neurobiol Dis* 7, 54-63.
- Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., De Strooper, B., und Bezprozvanny, I. (2010). Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *J Neurosci* 30, 8566-8580.
- Zhang, X., Garbett, K., Veeraghavalu, K., Wilburn, B., Gilmore, R., Mirnics, K., und Sisodia, S.S. (2012). A Role for Presenilins in Autophagy Revisited: Normal Acidification of Lysosomes in Cells Lacking PSEN1 and PSEN2. *J Neurosci* 32, 8633-8648.
- Zheng, H., und Koo, E.H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6, 27.
- Zhou, Q., Homma, K.J., und Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749-757.
- Ziv, N.E., und Smith, S.J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91-102.
- Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., und Gan, W.B. (2005a). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46, 181-189.
- Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., und Gan, W.B. (2005). Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 436, 261-265.

9 Eigene Veröffentlichungen

Publikationen und Manuskripte, die im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden sind:

- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Jung, C.K.E., Volbracht, C., Steiner, H., Mitteregger, G., Kretschmar, H.A., Haass, C., und Herms, J. (2009) Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci* **29**, 10405-10409
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C.K.E., Burgold, S., Page, R.M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F.M., Kretschmar, H., und Herms, J. (2010) Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **13**, 411-413
- Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., Honarnejad, K., Van Leuven, F., und Herms J. (2011) Role of presenilin 1 in structural plasticity of cortical dendritic spines in vivo. *J Neurochem* **119**, 1064-1073
- Hokkanen, S., Feldmann, H.M., Ding, H., Jung, C.K.E., Bojarski, L., Renner-Müller, I., Schüller, U., Kretschmar, H., Wolf, E., und Herms, J. (2011) Lack of Pur-alpha alters postnatal brain development and causes megalencephaly. *Hum Mol Genet* **21**, 473-484
- Jung, C.K.E., und Herms, J. (2012) Role of APP for dendritic spine formation and stability. *Exp Brain Res* **217**, 463-470
- Jung, C.K.E., und Herms, J. Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment – an in vivo imaging study. Manuskript in zweiter Revision bei Cereb Cortex
- Honarnejad, K., Jung, C.K.E., und Herms, J. Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease. Manuskript in Revision bei J Cell Mol Med
- Jung, C.K.E., Keppler, K., Stenudd, M., Brandt Elvang, A., Volbracht, C., und Herms, J. Pharmacological inhibition of BACE1 impairs the formation of dendritic spines. Manuskript in Vorbereitung mit Einladung für J Clin Invest

Poster

Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., und Herms, J. (2009) Effects of an enriched environment on structural plasticity of dendritic spines – an in vivo study. Interakt PhD Symposium – München, Deutschland

Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., und Herms, J. (2009) Effects of an enriched environment on structural plasticity of dendritic spines – an in vivo study. International conference on Alzheimer's disease – Wien, Österreich

Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H.K., und Herms, J. (2009) Effects of an environmental enrichment on dendritic spine structural plasticity – an in vivo two-photon imaging study. Neuroscience – Chicago, USA

Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., Van Leuven, F., und Herms, J. (2010) The role of Presenilin1 in dendritic spine plasticity. Neuroscience – San Diego, USA

Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., Van Leuven, F., und Herms, J. (2010) The role of Presenilin1 in dendritic spine plasticity. Eibsee Meeting on Cellular Mechanisms of Neurodegeneration – Grainau, Deutschland

Stenudd, M.E., Jung, C.K.E., Keppler, K., und Herms, J. (2011) In vivo analysis of BACE1 inhibition effects on dendritic spines. Amgen Scholars symposium – Cambridge, UK

Vorträge

The use of in vivo microscopy to study AD-related synaptic changes (2008) PhD-retreat, Frauenchiemsee, Deutschland

Dendritic spine imaging in “smarter” mice (2009) PhD-retreat, Grainau, Deutschland

The role of Presenilin1 in dendritic spine plasticity (2010) SFB-Report, München, Deutschland

Pharmacological inhibition of BACE1 impairs the formation of dendritic spines (2011) Lundbeck A/S, Kopenhagen, Dänemark

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Jochen Herms bedanken, für die Betreuung, das Vertrauen in mich und die Unterstützung, die diese Doktorarbeit möglich gemacht haben.

Ein großes Danke geht an Prof. Dr. Martin Biel, der so nett war, kurzfristig die Vertretung dieser Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu übernehmen.

Danke auch an Prof. Dr. Dr. Hans Kretschmar, der als Leiter des Zentrums für Neuropathologie die Grundlage für die hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen am Institut geschaffen hat und der sich bereit erklärt hat, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Bei Dr. Stelios Michalakis möchte ich mich für sein stetiges Entgegenkommen, die Hilfe bei den Virusarbeiten und die Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit bedanken.

Außerdem haben sich Prof. Dr. Klaus Förstemann und Prof. Dr. Stefan Zahler als Gutachter dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Während meiner Doktorarbeit durfte ich mit vielen Wissenschaftlern zusammenarbeiten, diskutieren und von ihnen lernen, auch wenn nicht alle Pläne Früchte getragen haben. Namentlich erwähnen und bedanken möchte ich mich bei Dr. Christiane Volbracht, Dr. Michael Willem und Prof. Dr. Stefan Kins.

Ganz wichtig war für mich ein freundschaftliches Klima im Labor-Alltag und darüber hinaus. Ein besonderer Dank daher an Kevin, Hanna und Steffen, dass Ihr mehr als Kollegen für mich seid. Aber auch allen anderen aus dem Hermslabor, den für mich wichtigen Menschen aus dem restlichen, auch ehemaligen, ZNP und aus dem Haass-Labor ein Danke für viele schöne Momente, die mir gerade an den zähen Tagen des Doktorandenlebens eine Stütze waren. Martin und Tobi, Danke für Eure Hilfe beim Einstieg in die Zwei-Photonen-Mikroskopie. Besonderer Dank an Sonja, aber auch an Julia, Caro, Olga und den Tierstall für die vielen großen und kleinen Arbeiten.

Danke an Nadine, die mich die ersten anderthalb Jahre in München begleitet hat.

Ein unglaublich liebes Dankeschön an meine Eltern, denen ich diese Arbeit widmen möchte. Gemeinsam mit Jane und Basti wisst Ihr vier, wie wichtig Ihr seid.

Ein letztes, ganz liebes Dankeschön geht an mein Schninchen.